Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

ZUM MECHANISMUS DER ANTIKONVULSIVEN WIRKUNG DER HEXACHLORCYCLOHEXANE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Horst-Wilhelm Vohland
aus Gruna

1966

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535712_0003

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

Zum Mechanismus der antikonvulsiven Wirkung der Hexachlorcyclohexane

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Horst- Wilhelm Vohland
aus Gruna

Dekan: Professor Dr. med. Wilhelm Maßhoff
Referent: Professor Dr. med. Wolfgang Koransky
Korreferent: Professor Dr. med. H. Selbach

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 6. Juni 1966

Inhalt

Einleitung

Literaturübersicht: Die antikonvulsive Wirksamkeit der Hexachlorcyclohexane S. 3
Fragestellung S. 6

Methodik und Versuchsergebnisse

Der Einfluß der Hexachlorcyclohexane auf die narkotische Wirkung von Evipan und Eunarkon

Versuchsanordnung S. 8
Narkosezeitverkürzung durch alpha-HCH-Vorbehandlung S. 9
Narkosezeitverkürzung durch beta-HCH-Vorbehandlung S. 9
Narkosezeitverkürzung durch gamma-HCH-Vorbehandlung S. 15

Evipanabbau in vitro nach einmaliger HCH-Vorbehandlung

Bestimmung des Evipanabbaues in vitro S. 18
Evipanabbau bei unvorbehandelten Kontrolltieren S. 22
Beschleunigung des Evipanabbaues durch alpha-HCH-Vorbehandlung S. 22
Beschleunigung des Evipanabbaues durch beta-HCH-Vorbehandlung S. 24
Beschleunigung des Evipanabbaues durch gamma-HCH-Vorbehandlung S. 24

Toxizitätsverlust von Scillirosid nach einmaliger HCH-Vorbehandlung

Vergiftungsbild und Versuchsanordnung S. 28
Toxizitätsverlust von Scillirosid nach alpha-HCH-Vorbehandlung S. 29
Toxizitätsverlust von Scillirosid nach beta-HCH-Vorbehandlung S. 31
Toxizitätsverlust von Scillirosid nach gamma-HCH-Vorbehandlung S. 31

Toxizitätsverlust von Cardiazol nach einmaliger, intraperitonealer HCH-Vorbehandlung

Toxizitätsverlust von Cardiazol nach alpha- HCH-Vorbehandlung S. 35
Toxizitätsverlust von Cardiazol nach beta- HCH-Vorbehandlung S. 36
Toxizitätsverlust von Cardiazol nach gamma- HCH-Vorbehandlung S. 36

Mintacolabbau in vitro nach einmaliger HCH-Vorbehandlung

Bestimmung der Mintacolspaltung in vitro S. 38
Mintacolabbau bei unvorbehandelten Kontrolltieren S. 41
Beschleunigung der Mintacolspaltung durch alpha-HCH-Vorbehandlung S. 41
Beschleunigung der Mintacolspaltung durch beta-HCH-Vorbehandlung S. 42
Beschleunigung der Mintacolspaltung durch gamma-HCH-Vorbehandlung S. 43
Mintacolabbau in einzelnen Leberzellfraktionen S. 45
Mintacolabbau in verschiedenen Organen nach alpha-HCH-Vorbehandlung S. 47

Diskussion S. 48

Zusammenfassung S. 60

Literatur S. 61

Lebenslauf S. 71

Einleitung

1. Literaturübersicht:

Die antikonvulsive Wirksamkeit der Hexachlorcyclohexane

Aus der Reihe der chlorierten Kohlenwasserstoffe, deren chemische Eigenschaften schon seit langem bekannt sind, fand nach dem Krieg besonders das gamma-Isomer des Hexachlorcyclohexans (γ-HCH) als Kontaktinsektizid Verwendung. Versuche, diese Substanz in die medizinische Therapie einzuführen, z.B. als Anthelminthicum, scheiterten an ihrer Toxizität. So sind zahlreiche Vergiftungsfälle mit zum Teil tödlichem Ausgang bis in die jüngste Zeit hinein beobachtet worden (Buck u. Pfannemüller 11, Stur u. Zweimüller 88 u.a.). Dabei steht besonders die Wirkung der HCH auf das Zentralnervensystem im Vordergrund. Diese ist für die einzelnen Isomeren des HCH spezifisch und tritt bald nach Applikation der Substanzen auf. Sie wurde nach Gabe der reinen HCH-Isomeren ausführlich von Herken und anderen Autoren beschrieben.

Als hervorstechende Merkmale einer HCH-Intoxikation fanden Herken u. Mitarb. nach einmaliger oraler Zufuhr einer höheren Dosis von

alpha-HCH Zeichen einer Erregung des Nervensystems in Form eines feinschlägigen Tremors der Extremitäten, der besonders deutlich wurde, wenn man die Versuchstiere am Schwanz hochhob (20). Ein zur gleichen Zeit aufgenommenes Elektroenzephalogramm wies nur geringfügige Abweichungen von der Norm auf (21).

beta-HCH zeigte in höheren Dosen zentrallähmende Wirkungen sowie eine auffallende Schlaffheit der Skelettmuskulatur (20, 44, 45). Im Elektroenzephalogramm war hier eine Beschleunigung des 5-6 Hz-Grundrhythmus und eine Steigerung der Amplitudenhöhe dieser Wellen zu beobachten (21).

gamma-HCH wirkte schon bald nach Verabreichung einer höheren Dosis als Krampfgift. Als initiale Vergiftungserscheinungen traten generalisierte Krampfanfälle auf (18, 20, 44, 46). Noch am 4. Tag nach der HCH-Gabe fielen im Elektroenzephalogramm "amplitudengroße Wellen des Grundrhythmus, ähnlich den Abweichungen mit kleinen, nicht krampfauslösenden Dosen von Cardiazol" auf (21).

Diese sichtbaren Vergiftungserscheinungen treten in den ersten Stunden nach der HCH-Gabe auf und sind nach einigen Tagen nicht mehr nachweisbar. Die Versuchstiere verhalten sich nach Überstehen der Vergiftung wieder normal. Wenn man jedoch solchen Versuchstieren höhere Dosen verschiedener, krampfauslösender Pharmaka injiziert, so zeigt sich, daß die zu erwartenden Krampfanfälle bei einem großen Teil von ihnen über einen längeren Zeitraum ausbleiben. Diese antikonvulsive Wirkung der HCH wurde von Herken u. Mitarb. näher untersucht. Ihre Ergebnisse werden, da sie der Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit sind, kurz wiedergegeben.

Injiziert man weißen, weiblichen Ratten nach einmaliger, oraler Gabe von HCH 3–4 Tage nach der Vorbehandlung 8o mg/kg Cardiazol (Pentamethylentetrazol) subcutan, so bleiben die zu erwartenden, schweren, tonisch-klonischen Cardiazolkrämpfe bei einem Teil der Tiere aus. Bei allen nicht vorbehandelten Kontrolltieren traten sie nach dieser Cardiazoldosis auf (2o,4o,44). Ein besonders stark ausgeprägter Schutz vor den Cardiazolkrämpfen zeigte sich nach einer alpha-HCH-Gabe. Er war am 4. Tag nach der Vorbehandlung am größten. An diesem Tage blieben etwa 9o % der Tiere krampffrei. Nach 7–8 Tagen ließ sich keine Krampfhemmung mehr nachweisen (2o,4o,41,44,45,47). Nach einer beta-HCH-Applikation stellte sich die krampfhemmende Wirkung des HCH langsamer ein. Am 4. Tag wurden zwischen 55 und 7o % der vorbehandelten Tiere vor den Krämpfen geschützt. Nach 6–8 Tagen war der Effekt am stärksten ausgeprägt und nach etwa zwei Wochen nicht mehr nachweisbar (4o,41,44,45,47). Unter der Wirkung des gamma-HCH entwickelte sich erst nach drei Tagen, wenn keine initialen Krämpfe mehr auftraten, eine deutliche Hemmung der Cardiazolkrämpfe. Das Maximum der Krampfhemmung wurde um den 4. Tag nach der Vorbehandlung gefunden, an dem 5o- 6o % der vorbehandelten Tiere keine Cardiazolkrämpfe zeigten. Der Effekt des HCH hielt insgesamt etwa 8 Tage an (2o,4o,41,44,45,47).

Die krampfhemmende Wirkung der HCH wurde auch bei anderen Analeptica untersucht. So ließen sich Pikrotoxinkrämpfe durch eine alpha-HCH-Gabe nicht unterdrücken (19,44,45,47). Beta-HCH vermochte nur in höherer Dosierung in einem gewissen Umfang die Pikrotoxinkrämpfe aufzuheben (19,44,45,47). Nach einer gamma-HCH-Applikation konnte am 4. Tag nach der Vorbehandlung ein Schutz gegen Pikrotoxin bei 5o % der Tiere festgestellt werden (19,44, 45,47).

Bei Versuchen mit Coramin (Nikotinsäurediäthylamid) erwiesen sich alpha-, beta- und gamma-HCH als antikonvulsiv wirksam. Am 4. Tag wurden durch die drei HCH-Isomeren bei allen vorbehandelten Versuchstieren die generalisierten Krampfanfälle unterdrückt (19,45,47).

Weiterhin konnte Herken zeigen, daß der Strychnintetanus bei einem Teil der Versuchstiere mit gamma-HCH verhindert werden kann (41,42,43).

Die Untersuchungen sind auch auf die Cholinesterasegifte Prostigmin, Physostigmin, Paraoxon, Parathion und auf das Carbacholin ausgedehnt worden.

So wurde die konvulsive Wirkung von Prostigmin durch alpha-, beta- und gamma-HCH deutlich eingeschränkt. Dabei war das Maximum der Krampfhemmung am 7. Tag nach der Vorbehandlung zu erkennen. Durch die HCH-Isomeren wurden die typischen Prostigminkrämpfe bei etwa der Hälfte der Versuchstiere unterbunden. Die fibrillären Muskelzuckungen sowie die Schüttellähmungen traten dabei nicht auf. Nach etwa zwei Wochen war die Wirkung des alpha- und beta-HCH wieder abgeklungen (44,45).

Gegenüber Physostigmin zeigte keines der drei HCH-Isomeren eine krampfhemmende Wirkung (44,45,48).

Die Wirkung von Mintacol (Diäthyl-p-Nitrophenylphosphat, Paraoxon) wurde bei Ratten durch alpha- und beta-HCH am 4. Tag vollständig aufgehoben, durch das gamma-Isomer nur zu 33 % (19,66).

Analog dazu zeigten Ball et al. (6), daß Versuchstiere, die mit Lindan (gamma-HCH) vorbehandelt worden waren, die 2-3 fache Menge Parathion (Diäthyl-p-Nitrophenylthiophosphat, E-605) vertragen, wenn dieses drei Tage nach der Vorbehandlung gegeben wird.

Die Wirkung des Cholinderivates Doryl (Carbaminoylcholin) wurde durch HCH wenig beeinflußt. Am 4. Tag nach der Applikation verhinderte Alpha-HCH die Dorylkrämpfe bei etwa 30 % der Tiere. (19).

Die Frage, ob eine HCH-Vorbehandlung elektrisch induzierte Krampfanfälle verhindern kann, beantworteten Kewitz u. Reinert (55). Sie demonstrierten, daß alpha- und gamma-HCH die Elektrokrampfschwelle nicht erhöhen. Anders verhielt sich das beta-Isomer. Es erhöhte die Krampfschwelle bereits 24 Std. nach der Verabreichung maximal und hielt sie auf diesem Niveau für weitere 4 Tage. Danach nahm sie bis zum 8. Tag wieder ab.

Fragestellung

Zahlreiche weitere Untersuchungen, die von Herken u. Mitarb. durchgeführt wurden, galten der Aufklärung der krampfhemmenden Wirkung der HCH. Es wurde dabei vor allem von der Annahme ausgegangen, daß die HCH am Zentralnervensystem angreifen und die Funktion der Nervenzellen (18,45) oder deren Stoffwechsel (47) so verändern, daß die konvulsive Wirkung zahlreicher Pharmaka nicht mehr zustande kommen kann. Um diese von den HCH hervorgerufenen Veränderungen zu erfassen, untersuchten sie die Funktion einzelner Abschnitte des Gehirns unter der Wirkung der Vorbehandlung sowie den Einfluß der HCH auf den Stoffwechsel des Acetylcholins, die Konzentration und den Stoffwechsel der Nukleotide des Gehirns und das System Glutamin- Glutaminsäure-γ- Aminobuttersäure. Auf ihre Versuchsergebnisse, insbesondere auf deren Bedeutung für das Zustandekommen der Krampfhemmung, soll in der Diskussion eingegangen werden.

Einen anderen Weg, die Ursache der krampfhemmenden Wirkung der HCH zu finden, gingen Koransky u. Portig (58), indem sie das Schicksal der HCH im Organismus verfolgten. Dabei konnten zwei wichtige Befunde erhoben werden: 1. Die HCH vermögen ihren eigenen Stoffwechsel zu beschleunigen. 2. Die Metabolisierung der HCH ist durch Vorbehandlung der Versuchstiere mit Luminal zu beschleunigen. Luminal und die HCH haben also beide einen fördernden Einfluß auf das gleiche Fermentsystem. Luminal gehört zu den stärksten Aktivatoren der in den Lebermikrosomen lokalisierten Enzyme (Conney u. Burns 13, Remmer 73-77 ua.), durch die sehr viele körperfremde Substanzen entgiftet werden (Übersicht s. Axelrod 5 , Brodie et al. 1o). Wenn die HCH dieses Fermentsystem aktivieren, so könnte die beobachtete Krampfhemmung auf einer beschleunigten Metabolisierung der getesteten Krampfgifte beruhen.

Als Anhaltspunkt dafür, daß die HCH die oxydierenden Enzyme der Leber aktivieren, kann die Beobachtung von Herken,Kewitz u. Klempau (45) gelten, daß die Schlaftiefe der mit alpha-HCH vorbehandelten Versuchstiere nach Gabe von Diallylbarbitursäure geringer ist als bei unvorbehandelten Kontrollen, denn dieses Barbiturat verliert seine Wirkung durch Oxydation in den Lebermikrosomen (Cooper u. Brodie 16, 17).

Auch die beschriebene Latenzzeit bis zum Zustandekommen der Krampfhemmung weist auf einen Zusammenhang zwischen der antikonvulsiven Wirkung der HCH und der Aktivierung der Lebermikrosomenenzyme hin. In den Experimenten von Koransky u. Portig hatte sich nämlich in dem gleichen Zeitraum eine Beschleunigung des HCH-Stoffwechsels mit ähnlichem Verlauf gezeigt.

So wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, weitere Argumente dafür zu erbringen, daß die HCH Aktivatoren der mikrosomalen Fermente sind und geprüft, ob der beobachtete Wirkungsverlust der zahlreichen Krampfgifte, die sich in ihrem chemischen Aufbau, ihrem Angriffspunkt im Organismus und in ihren Wirkungsmechanismen sehr unterscheiden, auf einer beschleunigten Entgiftung beruhen kann.
Dazu wurde der Einfluß der HCH auf die narkotische Wirkung von Evipan und Eunarkon bestimmt und der zeitliche Verlauf des Wirkungsverlustes mit dem Ablauf der antikonvulsiven Wirkung der HCH gegenüber Scillirosid und Cardiazol verglichen. Zur gleichen Zeit wurde in vitro die Schlafmitteloxydation durch Lebermikrosomenenzyme und die enzymatische Hydrolyse des Mintacols in den verschiedenen Organen untersucht.

Der Einfluß der Hexachlorcyclohexane auf die narkotische Wirkung von Evipan und Eunarkon

Um Aufschluß über die Wirkung der HCH auf die Mikrosomenenzyme zu erhalten, wurde die narkotische Wirkung von Evipan und Eunarkon nach einmaliger, intraperitonealer HCH-Gabe getestet. Diese Barbiturate werden wegen ihrer hohen Lipoidlöslichkeit nicht unverändert durch die Nieren ausgeschieden (Bush, Butler u. Dickison 12), sondern vorher durch Seitenkettenoxydation in den Lebermikrosomen in unwirksame Metabolite verwandelt (Cooper u. Brodie 16, 17). Da die Wirkungsdauer dieser Barbiturate also im wesentlichen von der Geschwindigkeit des Abbaues abhängt, zeigt sich eine Aktivierung der oxydierenden Leberenzyme in einer Verkürzung und ihre Hemmung in einer Verlängerung der Narkosedauer.

Versuchsanordnung

Weiße, weibliche Ratten im Gewicht von 110- 160 g, deren Ernährung aus Standardpreßfutter ("Altromin" der Fa. Altrogge) und Leitungswasser bestand, wurden mit einer einmaligen, intraperitonealen Injektion der reinen HCH-Isomeren vorbehandelt. Die Dosierung der HCH war dabei folgende:

alpha- HCH	200 mg/kg	2%ig in Rapsöl
beta - HCH	200 mg/kg	1%ig in Rapsöl
gamma - HCH	60 mg/kg	1,2%ig in Rapsöl

Die Kontrolltiere erhielten die entsprechende Menge Rapsöl intraperitoneal injiziert.

Die Barbitursäurederivate Evipan und Eunarkon wurden in den Tagen, die der HCH-Vorbehandlung folgten, ebenfalls intraperitoneal appliziert. Die Dosierung betrug für :

Evipan (N-Methylcyclohexenylmethyl- barbitursaures- Na)
100 mg/kg 5%ig in Aqua dest.

Eunarkon (N-Methyl-ß-bromallyl-isopropylbarbitursäure)
60 mg/kg 6%ig in Aqua dest.

Die Tiere schliefen bereits in den ersten beiden Minuten nach der Injektion ein und ließen sich in Rückenlage bringen. Dieser Augenblick wurde als der Beginn der Narkose gewertet. Als Ende der Narkose galt derjenige Augenblick, an dem sich die Tiere aus der Rückenlage befreiten und fortzubewegen begannen.

Verschiedene Autoren (Holtz, Balzer, Westermann u. Wezler 51, Remmer 72, Rümke u. Bout 84) haben bei ihren Versuchen mit Evipan starke Schwankungen in der Narkosezeit von Tag zu Tag gefunden. Deshalb wurde jeder HCH-vorbehandelten Versuchsgruppe, meistens 2o Tiere, unter den gleichen Bedingungen eine Kontrollgruppe zugeordnet. Der zeitliche Abstand zwischen den einzelnen Applikationen der Barbiturate betrug für die einzelnen Gruppen mindestens fünf Tage. Dieser Zeitraum ist so groß, daß die vorangegangene Injektion von Evipan oder Eunarkon keinen Einfluß mehr auf Wirkung der erneut applizierten Schlafmittel hat (Remmer 75).

Narkosezeitverkürzung durch alpha-HCH-Vorbehandlung

In Abb. 1a ist die Wirkung einer einmaligen alpha-HCH-Applikation auf die Dauer der Narkose, die nach Gabe von Evipan und Eunarkon eintritt, dargestellt. Es ist eine etwa 3o Tage anhaltende Verringerung der narkotischen Wirkung der beiden Barbitursäurederivate zu erkennen. Im Maximum des HCH-Effektes zwischen dem 7. und 14. Tag nach der Vorbehandlung ist die Evipannarkose auf etwa 3o % der Norm reduziert. Eunarkon vermag in diesem Zeitraum überhaupt keine Narkose mehr zu erzeugen. In der Spanne zwischen dem 14. und 3o. Tag nach der Vorbehandlung gleicht sich die Wirksamkeit der beiden Schlafmittel bei den vorbehandelten Versuchstieren wieder an die der unvorbehandelten Kontrolltiere an(Koransky u. Klempau unveröff. Versuche).

Narkosezeitverkürzung durch beta-HCH-Vorbehandlung

Einmalig mit ß-HCH vorbehandelte Versuchstiere zeigen gegenüber unvorbehandelten Kontrolltieren ebenfalls eine geringere Empfindlichkeit für Evipan und Eunarkon, die über einen Zeitraum von 6-7 Wochen zu beobachten ist.

Die Verkürzung der durch Evipan hervorgerufenen Narkose setzt in geringem Ausmaß schon am ersten Tag nach der Vorbehandlung ein. Sie beträgt am 2. Tag bereits etwa 3o % gegenüber den unvorbehandelten Kontrollen und zwischen dem 6. und 16. Tag etwa 5o % (Tab.1, Abb.2a). In diesen Tagen zeigt sich die stärkste Wirkung der ß-HCH-Vorbehandlung auf die Evipannarkose.

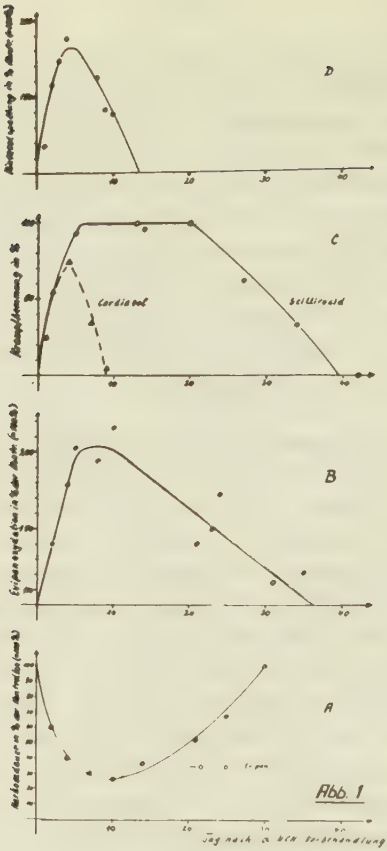


Abb. 1 Experimente nach einmaliger Vorbehandlung der Versuchstiere mit alpha- Hexachlorcyclohexan

Vorbehandlung : 2oo mg/kg alpha-HCH 2%ig in Rapsöl i.p.
Tiere: weiße, weibliche Ratten, 11o- 14o g

A Einfluß der Vorbehandlung auf die narkotische Wirkung von Evipan und Eunarkon
Evipan: 1oo mg/kg 5 %ig in Aqua dest. i.p.
Eunarkon: 6o mg/kg 6 %ig in Aqua dest. i.p.

B Evipanoxydation in vitro nach der Vorbehandlung
Substrat: 2oo. $1o^{-8}$ Mol Evipan
Enzym: Homogenat aus o,5 g Frischleber
Inkubation: 3o min. bei 37 Grad Celsius

C Toxizität von Scillirosid und Cardiazol nach der Vorbehandlung
Scillirosid: o,4 mg/kg o,oo5 %ig in gummi arab. i.p.
Cardiazol: 8o mg/kg 1%ig in Aqua dest. s.c.

D Mintacolabbau in vitro nach der Vorbehandlung
Substrat: 3oo .$1o^{-8}$ Mol Mintacol
Enzym: Homogenat aus o,2 g Frischleber
Inkubation: 3o min. bei 37 Grad Celsius

Tag nach HCH-Gabe	Tier-zahl HCH/Kontr.	Narkosedauer nach Evipaninjektion in min.		
		Kontrollen unvorbehand.	ß-HCH-Vorbe-handlung	nach HCH in % unvorbeh.Kontr.
1.	19/1o	111 ± 23	1oo ± 47	9o ± 42
2.	2o/1o	121 ± 37	86 ± 24	71 ± 19
4.	18/1o	117 ± 21	61 ± 19	52 ± 16
7.	2o/1o	126 ± 34	73 ± 24	58 ± 18
11.	18/1o	147 ± 48	74 ± 42	5o ± 29
14.	2o/9	1o7 ± 33	56 ± 25	52 ± 23
21.	18/9	112 ± 2o	79 ± 34	7o ± 3o
28.	33/18	1o2 ± 19	71 ± 25	69 ± 25
35.	34/18	1o6 ± 27	81 ± 29	77 ± 27
42.	33/18	1o6 ± 31	97 ± 36	91 ± 34

Tab. 1 Narkosedauer nach Injektion von Evipan nach einmaliger Vorbehandlung mit ß-Hexachlorcyclohexan

ß-HCH : 2oo mg/kg 1%ig in Rapsöl i.p.
Evipan : 1oo mg/kg 5%ig in Aqua dest. i.p.
Tiere : weiße, weibliche Ratten, 11o-13og

In den nachfolgenden vier Wochen verringert sich die Differenz in der Narkosedauer zwischen vorbehandelten und unvorbehandelten Versuchstieren wieder. Um den 42. Tag beträgt sie nur noch etwa 1o %, d.h. der Einfluß von ß-HCH auf die narkotische Wirkung von Evipan ist in dieser Anordnung nicht mehr sicher nachzuweisen.

Auch auf die durch Eunarkon hervorgerufene Narkose wirkt ß-HCH in ähnlicher Weise. Der Zeitpunkt des maximalen HCH-Einflusses und die Dauer der Narkosezeitverringerung weichen im wesentlichen nicht von den Werten ab, die sich beim Evipan ergeben hatten. Die Intensität der HCH-Wirkung auf die Eunarkonnarkose ist dagegen größer. Die stärkste Reduktion der durch Eunarkon hervorgerufenen Narkose liegt zwischen dem 4. und 12. Tag nach der Vorbehandlung und beträgt 7o- 8o % der Norm. Die vorbehandelten Versuchstiere schlafen zwischen 15 und 3o Minuten, die unvorbehandelten Kontrollen dagegen zwischen 77 und 94 Minuten. Nach dem Höhepunkt des HCH-Effektes stellt sich innerhalb von 3o Tagen die volle Wirkung des Eunarkons bei den vorbehandelten Versuchstieren wieder ein (Abb.1b, Tab. 2).

Sowohl bei den vorbehandelten Versuchstieren als auch bei den unvorbehandelten Kontrolltieren zeigten sich erhebliche Streuungen in den Narkosezeiten nach Evipan- oder Eunarkoninjektion. Sie betrugen zwischen 15 und 5o % der erhaltenen Werte. Dieser Betrag konnte trotz weitgehend einheitlichen Tiermaterials, standardisierter Ernährung und gleicher Haltung der Tiere - (gleicher Raum, gleichbleibende Umgebungstemperatur, größte Sauberkeit der Käfige)- nicht verringert werden. So schliefen z.B. von 18 ß-HCH-vorbehandelten Tieren, die Eunarkon erhalten hatten, am 4. Tag 13 überhaupt nicht, 5 dagegen zwischen 2o und 5o Minuten. Daraus ergibt sich für die gesamte Versuchsgruppe eine mittlere Narkosezeit von 12 Minuten, etwa einem Sechstel der normalen Narkosedauer.

Die Narkose scheint bei allen vorbehandelten Versuchstieren sowohl nach Evipan- als auch nach Eunarkonapplikation nicht so tief zu sein wie bei den unvorbehandelten Kontrolltieren.

Tag nach HCH-Gabe	Tier-zahl HCH/Kontr.	Narkosedauer nach Eunarkoninjektion in min.		
		Kontrollen unvorbehand.	ß-HCH-Vor-behandlung	Nach HCH in % unvorbeh.Kontr.
1.	2o/8	13o ± 68	55 ± 37	42 ± 28
4.	18/1o	42 ± 27	12 ± 16	27 ± 36
7.	18/7	77 ± 49	28 ± 29	36 ± 38
11.	17/9	8o ± 54	16 ± 7	2o ± 9
14.	16/7	94 ± 38	31 ± 18	33 ± 19
21.	17/9	73 ± 35	26 ± 14	36 ± 19
28.	28/16	7o ± 26	46 ± 16	66 ± 23
35.	26/16	71 ± 18	57 ± 1o	8o ± 14
42.	26/16	76 ± 36	7o ± 26	92 ± 34

Tab. 2 Narkosedauer nach Injektion von Eunarkon nach einmaliger Vorbehandlung mit ß-Hexachlorcyclohexan

ß-HCH: 2oo mg/kg 1%ig in Rapsöl i.p.
Eunarkon: 6o mg/kg 6%ig in Aqua dest. i.p.
Tiere: weiße, weibliche Ratten 11o-13o g

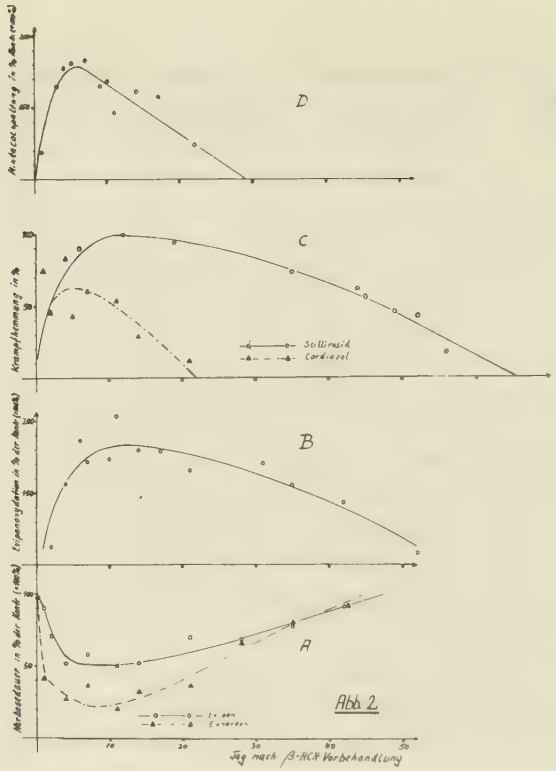


Abb. 2 Experimente nach einmaliger Vorbehandlung der Versuchstiere mit beta- Hexachlorcyclohexan

Vorbehandlung: 2oo mg/kg beta-HCH 1%ig in Rapsöl i.p.
Tiere : weiße, weibliche Ratten, 12o- 14o g

A Einfluß der Vorbehandlung auf die narkotische Wirkung von Evipan und Eunarkon
Evipan : 1oo mg/kg 5%ig in Aqua dest. i.p.
Eunarkon: 6o mg/kg 6%ig in Aqua dest. i.p.

B Evipanoxydation in vitro nach der Vorbehandlung
Substrat: $2oo.1o^{-8}$ Mol Evipan
Enzym : Homogenat aus o,5 g Frischleber
Inkubation: 3o min. bei 37 Grad Celsius

C Toxizität von Scillirosid und Cardiazol nach der Vorbehandlung
Scillirosid: o,4 mg/kg o,oo5 %ig in gummi arab. i.p.
Cardiazol : 8o mg/kg 1,o %ig in Aqua dest. s.c.

D Mintacolabbau in vitro nach der Vorbehandlung
Substrat: $3oo .1o^{-8}$ Mol Mintacol
Enzym : Homogenat aus o,2 g Frischleber
Inkubation: 3o min. bei 37 Grad Celsius

Narkosezeitverkürzung durch gamma-HCH-Vorbehandlung

Eine einmalige, intraperitoneale Gabe von gamma-HCH reduziert die narkotische Wirkung von Evipan und Eunarkon ebenfalls, jedoch über einen sehr viel kürzeren Zeitraum als nach alpha- oder beta-HCH-Vorbehandlung.
Bereits am 2. Tag nach der Vorbehandlung wird die Evipannarkose maximal verkürzt. Die vorbehandelten Versuchstiere schlafen zu diesem Zeitpunkt nur etwa 16 Minuten, die unvorbehandelten Kontrolltiere dagegen etwa 66 Minuten.(Tab. 3). Die Narkosedauer ist auf etwa 25- 35 % reduziert. Der Einfluß des gamma-HCH a-uf die narkotische Wirkung des Evipans läßt nach dem 3. Tag rasch nach und ist nach dem 12. Tag nach der Vorbehandlung nicht mehr sicher nachzuweisen.
Auch Eunarkon verliert nach der gamma-HCH-Gabe schnell an Wirksamkeit. Am 2. Tag nach der Vorbehandlung wird die narkotische Wirkung dieses Barbiturats um etwa 8o % verringert. Von 19 vorbehandelten Versuchstieren schlafen 15 überhaupt nicht, 4 dagegen zwischen 35 und 41 Minuten. Daraus ergibt sich bei den vorbehandelten Versuchstieren eine mittlere Narkosedauer von 8 Minuten gegenüber 56 Minuten bei den unvorbehandelten Kontrolltieren. Der Einfluß des gamma-HCH läßt beim Eunarkon etwas schneller nach als beim Evipan, so daß zwischen vorbehandelten und unvorbehandelten Versuchstieren nach dem 1o. Tag kein wesentlicher Unterschied mehr festzustellen ist. Ein Schlafversuch nach Ablauf der zweiten Woche nach der Vorbehandlung zeigte keine Differenz mehr auf.

Ein Vergleich der Wirkung der einzelnen HCH-Isomeren auf die Barbituratnarkosen zeigt folgendes Ergebnis :
Alpha-HCH reduziert die narkotische Wirkung von Evipan über einen Zeitraum von etwa 3o Tagen. Der gleiche Effekt dauert beim beta-HCH 46- 48 Tage und beim gamma- Isomeren ungefähr 13 Tage.
Der maximale Einfluß auf die Narkosedauer liegt für alpha- HCH und beta- HCH annähernd zu gleicher Zeit zwischen dem 6. und 14. Tag, für das gamma- Isomer dagegen wesentlich früher, nämlich um den 2. Tag nach der Vorbehandlung.
Die Intensität der Wirkung auf die Barbituratnarkosen weist ebenfalls deutliche Unterschiede auf. Alpha- und gamma-HCH reduzieren die Narkosezeit für Evipan auf 2o- 3o % der Norm, beta-HCH nur auf 5o %. Die Eunarkonnarkose wird von allen HVH-Isomeren stärker erniedrigt.

Tag nach HCH-Gabe	Tier-zahl HCH/Kontr.	Narkosedauer nach Evipaninjektion in min.		
		Kontrollen unvorbehand.	γ-HCH-Vorbehandlung	nach γ-HCH in % unvorbeh. Kontr.
2.	21/ 9	66 ± 28	16 ± 21	24 ± 31
4.	21/1o	113 ± 18	56 ± 37	49 ± 32
7.	18/ 9	86 ± 19	5.3 ± 18	62 ± 21
11.	2o/ 8	117 ± 16	99 ± 24	85 ± 2o
15.	19/ 8	89 ± 16	84 ± 24	94 ± 27
2o.	38/17	1o7 ± 18	1o1 ± 21	94 ± 2o

Tab. 3 Narkosedauer nach Injektion von Evipan nach einmaliger Vorbehandlung mit gamma- Hexachlorcyclohexan

gamma-HCH : 6o mg/kg 1,2%ig in Rapsöl i.p.
Evipan : 1oo mg/kg 5%ig in Aqua dest. i.p.
Tiere : weiße, weibliche Ratten, 12o-16o g

Tag nach HCH-Gabe	Tier-zahl HCH/Kontr.	Narkosedauer nach Eunarkoninjektion in min.		
		Kontrollen unvorbehand.	γ-HCH-Vorbehandlung	nach γ-HCH in % unvorbehand.Kontr.
2.	19/ 9	56 ±37	8 ± 16	14 ± 28
7.	18/ 9	57 ± 26	45 ± 13	79 ± 23
11.	12/ 9	74 ± 34	79 ± 23	1o7 ± 31
14.	18/ 8	1oo ± 21	87 ± 21	87 ± 21
2o.	3o/15	91 ± 25	93 ± 38	1o2 ± 42

Tab. 4 Narkosedauer nach Injektion von Eunarkon nach einmaliger Vorbehandlung mit gamma-Hexachlorcyclohexan

gamma-HCH: 6o mg/kg 1,2 %ig in Rapsöl i.p.
Eunarkon : 6o mg/kg 6 %ig in Aqua dest. i.p.
Tiere : weiße, weibliche Ratten, 12o- 16o g

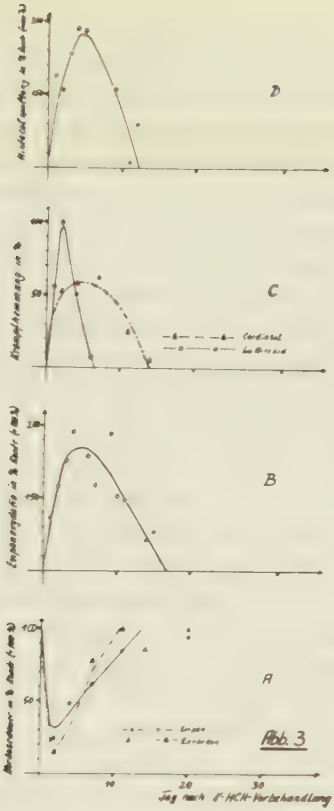


Abb. 3 Experimente nach einmaliger Vorbehandlung der Versuchstiere mit gamma- Hexachlorcyclohexan

Vorbehandlung: 6o mg/kg gamma-HCH 1,2%ig in Rapsöl i.p.
Tiere : weiße, weibliche Ratten, 11o- 14o g

A Einfluß der Vorbehandlung auf die narkotische Wirkung von Evipan und Eunarkon
Evipan: 1oo mg/kg 5%ig in Aqua dest. i.p.
Eunarkon 6o mg/kg 6%ig in Aqua dest. i.p.

B Evipanoxydation in vitro nach der Vorbehandlung
Substrat : 2oo. $1o^{-8}$ Mol Evipan
Enzym : Homogenat aus o,5 g Frischleber
Inkubation: 3o min. bei 37 Grad Celsius

C Toxizität von Scillirosid und Cardiazol nach der Vorbehandlung
Scillirosid: o,4 mg/kg o,oo5 %ig in gummi arab. i.p.
Cardiazol : 8o mg/kg 1 %ig in Aqua dest. s.c.

D Mintacolabbau in vitro nach der Vorbehandlung
Substrat: 3oo .$1o^{-8}$ Mol Mintacol
Enzym : Homogenat aus o,2 g Frischleber
Inkubation: 3o min. bei 37 Grad Celsius

Evipanabbau in vitro nach einmaliger HCH-Vorbehandlung

Wie die oben beschriebenen Tierversuche ergeben haben, setzt eine einmalige Vorbehandlung mit Hexachlorcyclohexanen die narkotische Wirkung von Eunarkon und Evipan über einen längeren Zeitraum herab. Da die Wirkungsdauer der getesteten Barbiturate im wesentlichen von der Geschwindigkeit ihrer Metabolisierung durch oxydierende Enzyme der Lebermikrosomen abhängt, wurde in vitro untersucht, ob der Wirkungsverlust von Evipan tatsächlich auf eine Beschleunigung des Abbaues zurückzuführen ist.

Bestimmung des Evipanabbaues in vitro

Als Versuchstiere dienten weiße, weibliche Ratten im Gewicht von 11o- 13o g bei den Versuchen mit alpha-HCH-Vorbehandlung und von 13o- 16o g bei denen mit beta- und gamma-HCH. Die Ernährung und Haltung der Tiere war die gleiche wie zur Prüfung der Narkosezeiten nach Eunarkon- und Evipangaben, die Vorbehandlung bestand ebenfalls in einer einmaligen, intraperitonealen Injektion der reinen HCH-Isomeren. (Dosis s.S. 8)

Zur Bestimmung der Evipanoxydation in vitro wurde die von Brodie et al. (9) angegebene und von Remmer (72) modifizierte Methode benutzt. Mit diesem Verfahren wird nur das Evipan, das nach einer bestimmten Inkubationszeit mit den Enzymen nicht zerstört wurde, nachgewiesen. Die beim Evipanabbau anfallenden Oxydationsprodukte (Ketoevipan, Norevipan u.a.) werden unter den angegebenen Bedingungen nicht mit erfaßt.

Folgende Versuchsbedingungen wurden eingehalten:

Nach Dekapitation der Versuchstiere und dem Ausbluten wurden die Lebern herauspräpariert und jeweils 2 g möglichst bindegewebsfreien Lebergewebes mit 1o ml Standardlösung(77 Teile 1,1 %ige KCl-Lösung, 3 Teile 5,5 %ige Glukoselösung und 2o Teile Phosphatpuffer n. Sörensen pH 7,4) in einem Potter- Elvehjem Homogenisator aus Plexiglas homogenisiert. Das während des Arbeitsganges auf Eis gelagerte Homogenat wurde sobald als möglich 1o Minuten bei 4o.ooo x g in einer Kühlzentrifuge (Fa.Phywe) bei 0°C zentrifugiert.

Dabei trennten sich noch intakte Zellen, Mitochondrien, Zellkerne und das Leberbindegewebe von dem Zellplasma ab. Die Fraktion des Zellplasmas mit den Lebermikrosomen diente als Enzympräparation.

Zur Messung des Evipanabbaues wurden folgende Inkubationsansätze zubereitet:

3 ml Enzympräparation
1 ml Evipanlösung (2,o µ Mol in 1 ml Aqua dest.)
1 ml TPN- Lösung (o,34 µ Mol TPN pro ml Phosphatpuffer)
1 ml Nikotinsäureamid- u. Magnesiumsulfatlösung (12,2 µ Mol $MgSO_4$ + 98,5 µMol NSA / ml)

6 ml Inkubationsansatz

Diese Ansätze wurden in 25 ml fassende Erlenmeyerkölbchen gegeben und 3o min. lang in einem Wasserbad bei 37 °C geschüttelt. Die Gasphase war Luft.

Die nach der Inkubation übrig gebliebene Evipanmenge wurde auf folgende Weise extrahiert und spektrophotometrisch bestimmt: In 4o ml fassende und durch Schliffstopfen verschließbare Zentrifugengläser wurden 3 ml der Inkubationslösung einpipettiert und mit 2o ml Petroläther (Kp.4o- 6o°C) versetzt. Durch anschließendes, einstündiges Rotieren der Gläser in einem Gestell erfolgte die Extraktion der verbliebenen Evipanmenge durch den Petroläther. Nachdem 15 Minuten dauerndes Zentrifugieren bei 3ooo U./min. beide Phasen sauber voneinander getrennt hatte, wurde ein aliquoter Teil des Petroläthers von 1o ml abermals in 4o ml fassende Zentrifugengläser übernommen und mit 5 ml Bikarbonatpuffer pH 11 versetzt. Die zweite Extraktion des Evipans aus dem Petroläther in den alkalischen Puffer erfolgte durch 3 Minuten anhaltendes Schütteln der Gläser in einem Gestell. Kurzes Zentrifugieren (3 min. bei 3ooo U./min.) trennte die wässrige Phase gut von dem Petroläther, so daß der Bikarbonatpuffer gut durch den Petroläther hindurch abpipettiert werden konnte. Die Bestimmung der Evipankonzentration im Bikarbonatpuffer erfolgte mit Hilfe eines Spektrophotometers (Fa. Beckman) durch Messung der Extinktion gegen Aqua dest. beim Absorptionsmaximum des Evipans in alkalischer Lösung, das bei 244 mµ liegt.

Zur Berechnung des Evipanabbaues dienten noch folgende Vergleichsmessungen:

1. Der Leerwert. Zu dessen Bestimmung wurde ein Inkubationsansatz nach dem oben angegebenen Schema zubereitet, inkubiert und extrahiert, dem statt der Evipanlösung 1 ml Aqua dest. zugesetzt wurde.

2. Der Eichwert. Er wird durch diejenige Menge Evipan dargestellt, die maximal von den 2 µ Mol aus dem Inkubationsansatz wieder zu extrahieren ist. Er wurde dadurch gewonnen, daß ein Inkubationsansatz mit allen oben angeführten Bestandteilen beschickt, kurz geschüttelt und bei einem aliquoten Teil von 3 ml sofort die Extraktion eingeleitet wurde. Da hierbei kein wesentlicher enzymatischer Abbau von Evipan stattfindet, konnte die für den Eichwert gemessene Extinktion als 2 µ Mol entsprechend eingesetzt werden.

3. Die spezifische Extinktion von Evipan in Bikarbonatpuffer pH 11. Sie wurde mit Hilfe einer Verdünnungsreihe bestimmt. Sie betrug $E = 6{,}91$ ($d = 1$ cm, $\lambda = 244$ mµ, $c = 1.10^{-6}$ Mol Evipan /ml.) .

Die Leer- und Eichwerte wurden bei jedem Versuch bestimmt. Der Evipanabbau pro Zeiteinheit wurde unter Zuhilfenahme der folgenden Gleichung berechnet:

$$\text{Evipanabbau} = \frac{(E_{to} - E_{t\ 3o}) \cdot F \cdot V}{E}$$

E_{to} = Evipanmenge vor Inkubationsbeginn (= Eichwert)

$E_{t\ 3o}$ = Evipanmenge nach 3o min. Inkubation bei 37 °C

F = Faktor zum Ausgleich des Evipanverlustes bei Extraktion

E = spezifische Extinktion von Evipan in Bikarbonatpuffer pH 1

Wie die Narkosedauer in vivo, so ist auch der Evipanabbau in vitro starken Schwankungen unterworfen. Es wurden deshalb gleichzeitig mit den Lebern HCH-vorbehandelter Versuchstiere auch diejenigen einer unvorbehandelten Kontrollgruppe aufgearbeitet. Für die Berechnung einer Aktivitätsänderung wurde die von den Lebern unvorbehandelter Versuchstiere abgebaute Evipanmenge jeweils gleich loo % gesetzt.

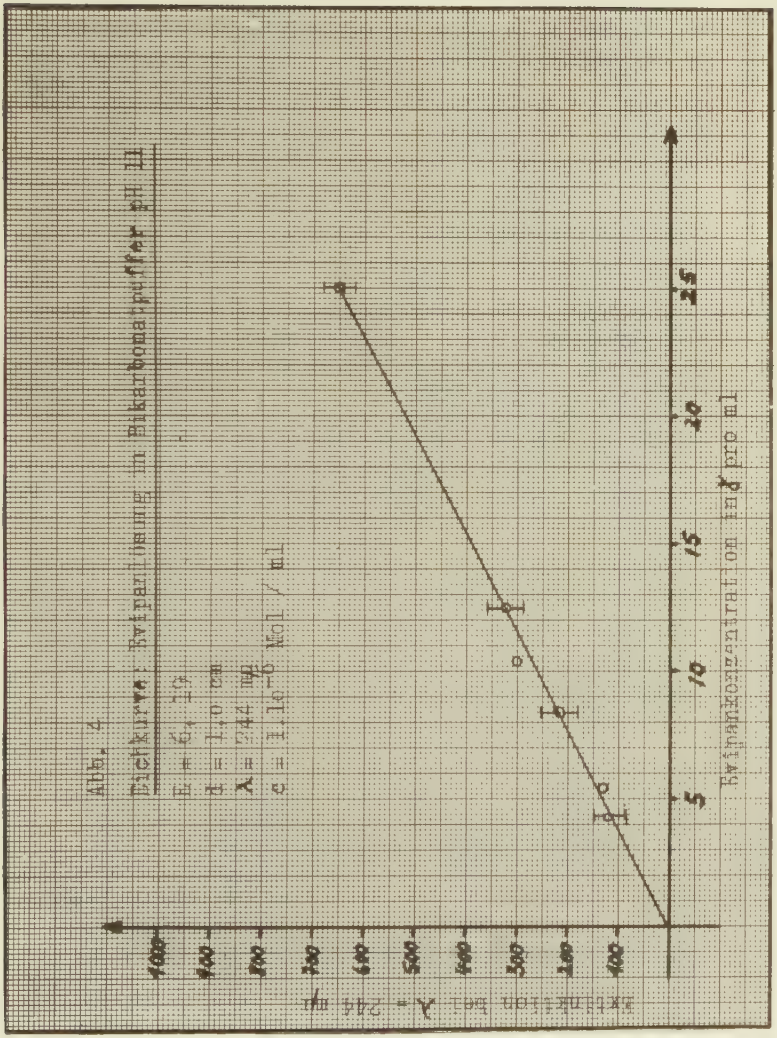


Abb. 4
Eichkurve: Extinktionen im Bikarbonatpuffer pH 11
E = 47 ig
d = 1,0 cm
λ = 244 mμ
c = 1,1 · 10⁻⁶ Mol / ml
Extinktion bei λ = 244 mμ
Bikarbonatkonzentration in d pro ml

a) Evipanabbau bei unvorbehandelten Kontrolltieren

Bei den Bestimmungen der Evipanoxydation nach HCH-Vorbehandlung war jeder vorbehandelten Tiergruppe eine Gruppe unvorbehandelter Kontrolltiere zugeordnet worden. Es wurde deshalb bei 35 weißen, weiblichen Ratten im Gewicht zwischen 12o und 18o Gramm die biochemische Umwandlung des Evipans durch Enzyme der Lebermikrosomen geprüft. Es ergab sich ein mittlerer Abbau von 48,8 $\pm$ 11,6 $.1o^{-8}$ Mol Evipan, wenn Homogenat aus o,5 g Frischleber mit $2oo.1o^{-8}$ Mol Evipan 3o min. bei 37 °C inkubiert wurde. Damit wurden in der gewählten Inkubationszeit von 3o min. zwischen 18,6 und 3o,2 % der vorgelegten Substratmenge abgebaut. Dieser Betrag stimmt mit den Angaben von Remmer (78) überein.

b) Beschleunigung des Evipanabbaues durch alpha-HCH-Vorbehandlung

Die in Tab. 5 zusammengestellten Werte zeigen deutlich, daß durch die Leberhomogenate derjenigen Tiere, die eine einmalige, intraperitoneale Injektion von alpha-HCH erhalten hatten, mehr Evipan pro Zeiteinheit oxydiert wird als durch die Leberhomogenate unvorbehandelter Kontrolltiere.

Dieser Befund läßt sich bereits in den ersten Tagen nach der Vorbehandlung erheben. Am 2. Tag oxydieren die Lebermikrosomenenzyme der vorbehandelten Tiere in der gewählten Inkubationszeit 4o % mehr Evipan als die unvorbehandelten Kontrolltiere. Wie Abb. 1 b zeigt, nimmt die Differenz zwischen Kontrollen und vorbehandelten Tieren in den folgenden Tagen weiter zu . Am 4. Tag bewirkt die alpha-HCH-Injektion bereits einen Mehrabbau von 8o % und am 5. Tag von rund 1oo %. In dem Zeitraum vom 6. bis 12. Tag nach der Vorbehandlung liegt der Höhepunkt der HCH- Wirkung.Die Lebern vorbehandelter Tiere bauen etwa die doppelte Menge Evipan pro Zeiteinheit ab. Nach dem 1o. Tag beginnt sich diese Differenz wieder langsam zu verringern. Sie beträgt am 22. Tag nur noch 4o- 5o % und gegen den 32. Tag kaum mehr als 2o %. Der Einfluß der alpha-HCH-Wirkung auf den Evipanabbau ist, wie aus Abb. 1b hervorgeht, um den 36. Tag vollständig erloschen.

Tag nach HCH-Gabe	Tier-zahl	Evipanoxydation in vitro in 10^{-8} Mol		
		Kontrollen unvorbehand.	α-HCH-Vor-behandlung	nach α-HCH in % der Kontrollen
	9	59,5 ± 4,7		100 ± 7,9
2.	5		83,5 ± 7,8	140 ± 13,1
4.	5		106,3 ± 10,4	179 ± 17,5
5.	5		122,0 ± 11,9	208 ± 20,0
8.	14		115,0 ± 11,8	194 ± 19,9
10.	9		128,5 ± 20,0	216 ± 33,6
21.	4		83,4 ± 8,5	140 ± 14,3
	4	56,4 ± 3,2		100 ± 5,7
23.	4		84,3 ± 23,2	150 ± 41,2
	2	44,8 ± 5,8		100 ± 12,9
24	5		77,5 ± 13,0	173 ± 29,0
	3	47,7 ± 2,5		100 ± 5,25
31.	3		54,7 ± 5,8	115 ± 12,2
	9	59,5 ± 4,7		100 ± 7,9
35.	3		72,5 ± 3,8	122 ± 6,3

Tab. 5 Evipanabbau in vitro nach einmaliger Vorbehandlung der Versuchstiere mit alpha-Hexachlorcyclohexan

Substrat: 200 .10^{-8} Mol Evipan
Enzym : Homogenat aus 0,5 g Frischleber
Inkubation: 30 Minuten bei 37 Grad Celsius

c) Beschleunigung des Evipanabbaues durch beta-HCH-Vorbehandlung

Eine einmalige Applikation von ß-HCH vermag ebenfalls, wie aus Tab. 6 zu entnehmen ist, eine lange anhaltende Steigerung der biochemischen Umwandlung von Evipan hervorzurufen.

Schon einige Tage nach der Vorbehandlung tritt ein deutlicher Unterschied in der Geschwindigkeit der Evipanoxydation zwischen vorbehandelten und unvorbehandelten Versuchstieren auf. Er beträgt am 4. Tag etwa 7o % und vergrößert sich in den folgenden Tagen weiter, so daß die Abbausteigerung am 7. Tag nach der Vorbehandlung zwischen 75 und 8o % der Norm ausmacht. Über den folgenden Zeitraum von lo Tagen, vom 7. bis zum 17. Tag nach der HCH-Gabe, bleibt dieser Unterschied bestehen. Gegen den 2o. Tag beginnt die Wirkung der ß-HCH-Injektion auf den Evipanabbau nachzulassen. Wie langsam sich die Angleichung der Abbaugeschwindigkeit bei vorbehandelten Tieren an die der unvorbehandelten Kontrollen vollzieht, veranschaulicht Abb. 2 b. Am 35. Tag nach der Vorbehandlung bauen die vorbehandelten Versuchstiere noch etwa 5o - 6o % mehr Evipan pro Zeiteinheit ab als die unvorbehandelten Kontrollen. Sind es am 42. Tag noch rund 42 %, so ist am 53. Tag keine deutliche Differenz mehr festzustellen. Eine einmalige, intraperitoneale Injektion von ß-HCH vermochte also eine Steigerung des Evipanabbaues über mehr als sieben Wochen hervorzurufen.

d) Beschleunigung des Evipanabbaues durch gamma-HCH-Vorbehandlung

Eine ähnliche Wirkung auf die enzymatische Umwandlung von Evipan, wie sie sich für alpha- und beta-HCH ergab, konnte auch für das gamma-Isomer des HCH nachgewiesen werden. Hier fällt nur auf, daß schon unmittelbar nach der Vorbehandlung die Lebern dieser Tiere sehr viel mehr Evipan pro Zeiteinheit abbauen als diejenigen der unvorbehandelten Kontrollen. Der Tab. 7 ist zu entnehmen, daß die Differenz zwischen normalen und vorbehandelten Tieren am ersten Tag fast 4o %, dem darauffolgenden ca. 6o % und am 3. Tag bereits 8o % beträgt. Für die Dauer von zwei Tagen, von dem

Tag nach HCH-Gabe	Tier-zahl	Evipanoxydation in vitro in 10^{-8} Mol		
		Kontrollen unvorbehand.	ß-HCH-Vor-behandlung	nach ß-HCH in % unvorbeh.Kontrollen
	3	36,o ± 1,5		loo ± 4,3
2.	4		4o,5 ± 5,4	113 ± 14,9
4.	4		56,5 ± 2,6	157 ± 7,2
	3	43,3 ± lo,6		loo ± 24,6
6.	4		81,o ± 11,7	186 ± 26,9
	9	59,5 ± 4,7		loo ± 7,9
7.	5		lo2,o ± 11,o	171 ± 18,4
	3	43,5 ± lo,6		loo ± 24,4
lo.	4		75,5 ± 4,3	174 ± 9,9
	2	41,5 ± 5,3		loo ± 12,8
11.	3		85,5 ± 6,7	2o3 ± 16,1
	9	59,5 ± 4,7		loo ± 7,9
14.	5		lo7,o ± 14,9	18o ± 25,1
	3	43,5 ± lo,6		loo ± 24,4
17.	4		77,8 ± lo,3	179 ± 23,6
	9	59,5 ± 4,7		loo ± 7,9
21.	4		99,o ± lo,o	166 ± 16,8
	3	47,7 ± 2,5		loo ± 5,3
31.	3		81,6 ± 7,3	171 ± 15,5
	9	59,5 ± 4,7		loo ± 7,9
35.	4		93,o ± 7,6	156 ± 12,7
42.	2		86,o ± 1,5	144 ± 2,5
	3	47,7 ± 2,5		loo ± 5,3
53.	3		51,3 ± 1,4	lo8 ± 3,o

Tab. 6 Evipanabbau in vitro nach einmaliger Vorbehandlung mit beta- Hexachlorcyclohexan

Enzym : Homogenat aus o,5 g Frischleber
Substrat: 2oo.10^{-8} Mol Evipan
Inkubation: 3o Minuten bei 37° C

Tag nach HCH-Gabe	Tier-zahl	Evipanoxydation in vitro in 10^{-8} Mol		
		Kontrollen unvorbehand.	γ-HCH-Vorbehandlung	nach γ-HCH in % unvorb. Kontrollen
	3	75,5 ± 7,6		100 ± 10,1
1.	3		103,6 ± 11,8	137 ± 15,6
2.	5		119,0 ± 24,7	158 ± 32,8
3.	4		133,0 ± 17,0	176 ± 22,5
4.	5		148,0 ± 31,7	196 ± 42,0
	3	35,7 ± 1,5		100 ± 4,3
6.	3		64,0 ± 6,0	179 ± 16,8
	9	59,5 ± 4,7		100 ± 7,9
7.	5		94,5 ± 8,3	159 ± 13,9
	3	35,7 ± 1,5		100 ± 4,3
9.	4		69,6 ± 6,1	195 ± 17,1
	9	59,5 ± 4,7		100 ± 7,9
10.	4		90,0 ± 9,0	151 ± 15,1
	2	41,5 ± 5,4		100 ± 13,0
11.	4		62,0 ± 7,4	149 ± 17,9
	9	59,5 ± 4,7		100 ± 7,9
14.	3		72,2 ± 7,1	121 ± 11,9
15.	8		76,5 ± 4,6	128 ± 7,7

Tab. 7 Evipanabbau in vitro nach einmaliger Vorbehandlung der Versuchstiere mit gamma-Hexachlorcyclohexan

Substrat : 200 .10^{-8} Mol Evipan

Enzym : Homogenat aus 0,5 g Frischleber

Inkubation: 30 Minuten bei 37° C

3. bis 5. Tag nach der Vorbehandlung, ist die HCH-Wirkung auf die Evipanoxydation am stärksten. Der Evipanumsatz durch die Lebern vorbehandelter Versuchstiere ist in diesem Zeitraum nahezu verdoppelt. In den folgenden Tagen, dem 5. bis 14. Tag, zeigte sich eine relativ rasche Angleichung der Abbaugeschwindigkeit bei den vorbehandelten Versuchstieren an die unvorbehandelten. Besteht am 10. und 11. Tag noch ein Unterschied von nahezu 50 %, so ist dieser am 16. Tag so gut wie ausgeglichen.

Ein kurzer Vergleich der Wirkung der drei HCH-Isomeren auf die biochemische Umwandlung des Evipans durch Enzyme der Lebermikrosomen zeigt:
Die größte Beschleunigung der Evipanoxydation wird durch das alpha-HCH hervorgerufen. Es steigert den Evipanumsatz pro Zeiteinheit um mehr als 100 % der Norm. Es folgen gamma-HCH mit 90- 95 % und das ß-Isomer mit etwa 80 %. Das Maximum der HCH-Wirkung auf den Evipanabbau liegt nach alpha-HCH zwischen dem 6. und 12. Tag, nach beta-HCH zwischen 7. und 17. Tag und nach gamma-HCH zwischen dem 3. und 5. Tag nach der Vorbehandlung.
Die Dauer der Wirkung auf die Evipanumwandlung ist für die einzelnen HCH-Isomeren sehr unterschiedlich. Alpha-HCH beschleunigt die Spaltung des Evipans etwa 5, beta-HCH mehr als 7 und gamma-HCH kaum mehr als 2 Wochen.

Toxizitätsverlust von Scillirosid nach einmaliger HCH-Vorbehandlung

Experimente mit Scillirosid hatten ergeben, daß eine einmalige Vorbehandlung der Versuchstiere mit Hexachlorcyclohexanen die Toxizität des Glykosids soweit verringerte, daß die nach Applikation einer krampfauslösenden Dosis zu erwartenden Krampfanfälle bei einem großen Teil der Versuchstiere ausblieben (Herken 49).

Nachdem am Beispiel des Evipans gezeigt werden konnte, daß der Wirkungsverlust dieses Barbitursäurederivates mit einer starken Beschleunigung seiner biochemischen Umwandlung einhergeht, lag es nahe, einen solchen Zusammenhang auch als Ursache des Toxizitätsverlustes von Scillirosid anzunehmen. Beim Scillirosid ist jedoch der Stoffwechsel noch nicht aufgeklärt, so daß die biochemische Umwandlung in vitro nicht getestet werden kann. Deshalb wurde der Verlauf des Einflusses einer einmaligen HCH-Applikation auf die Wirksamkeit des Scillirosids untersucht.

a) Vergiftungsbild und Versuchsanordnung

Scillirosid ist für Nagetiere sehr giftig, besonders für weibliche Ratten (Winton 91 , Stoll u. Renz 85, Rothlin u. Schalch 83). Die nach Injektion einer höheren Dosis von Scillirosid aufeinander folgenden Vergiftungssymptome wurden von Winton, von Henschel (39) und von Rothlin und Schalch ausführlich beschrieben. In Anlehnung an Henschel läßt sich der Verlauf einer Scillirosidvergiftung nach den in den einzelnen Stadien dominierenden Symptomen in drei Stufen einteilen. Die erste ist vor allem durch den taumelnden Gang der Versuchstiere gekennzeichnet. Ihr Fell ist struppig. Sie zeigen wechselnd Unruhe oder Somnolenz. In der 2. Stufe liegen sie mit ausgestreckten hinteren Extremitäten, die sie beim Kriechen schleifend nachziehen. Die Körperhaltung ist bucklig. Während der 3. Stufe erleiden die Tiere anfallsweise tonisch- klonische Krämpfe. Sie strecken sich, bäumen sich auf und drehen sich um ihre Längsachse. Diese Rollkrämpfe sind ein charakteristisches Merkmal einer sehr schweren Scillirosidintoxikation. Zwischen den Krampfanfällen liegen die Tiere erschöpft auf der Seite. Viele von ihnen gehen während der sich wiederholenden Krämpfe zugrunde.

Die Vergiftungszeichen der zweiten und dritten Stufe wurden als Kriterien der Giftwirkung des Scillirosids gewertet. Sie sind nach intraperitonealer Injektion einer Dosis von o,4 mg/kg Scillirosid bei fast allen Tieren des Kollektivs zu beobachten. Diese Dosis liegt nahe der LD-5o, die nach Stoll u. Renz sowie Rothlin u. Schalch für weibliche, weiße Ratten o,43 mg/kg beträgt. Trat nach der HCH-Vorbehandlung keine Giftwirkung des Scillirosids zutage oder nur eine geringe, der Stufe 1 entsprechend, so wurden die Tiere als geschützt angesehen. Als nicht geschützt galten diejenigen Versuchstiere, bei denen Scillirosid Wirkungen der zweiten und dritten Stufe hervorrief. Die Beobachtung des Vergiftungsbildes erfolgte etwa 14- 16 Stunden nach der Scillirosidinjektion. Die charakteristischen Rollkrämpfe sind zu jenem Zeitpunkt voll ausgebildet.
Bei jedem Versuch wurde die Toxizität des Scillirosids an unvorbehandelten Kontrolltieren neu geprüft. Die vorbehandelten Versuchstiere wurden in zwei Gruppen aufgeteilt, so daß jede von ihnen nur alle 1o- 14 Tage in den Versuch genommen wurde.

b) Toxizitätsverlust von Scillirosid nach alpha-HCH-Vorbehandlung.

Prüft man nach einer einmaligen alpha-HCH-Injektion die Empfindlichkeit der Versuchstiere für die oben angegebene Scillirosiddosis, so zeigt sich, daß die Toxizität des Glykosids bei den vorbehandelten Versuchstieren vom 5. Tag an herabgesetzt ist. Zu diesem Zeitpunkt traten bei rund 9o % der Tiere keine Zeichen einer Scillirosidintoxikation mehr auf. Zwei der vorbehandelten Tiere zeigten, wie aus Tab. 8 zu ersehen ist, noch die typischen Scillirosidkrämpfe, 28 waren geschützt. Bei den unvorbehandelten Versuchstieren kam zur gleichen Zeit die schwere Scillirosidvergiftung dadurch zum Ausdruck, daß ein Tier gestorben war, 1o Krämpfe aufwiesen und 16 Erscheinungen der Stufe 2. Wie Abb. 1c zeigt, besteht die maximale antikonvulsive Wirkung der alpha-HCH-Vorbehandlung etwa vom 6. bis 2o. Tag nach der Injektion. Während dieses Zeitraumes ist die Toxizität des Scillirosids bei allen vorbehandelten Versuchstieren soweit herabgesetzt, daß sich keine schweren Vergiftungserscheinungen, vor allem Rollkrämpfe, mehr einstellen. Nach dem 2o. Tag läßt die antikonvulsive Wirkung der HCH-

Tag nach HCH-Gabe	Vergiftungserscheinungen nach Scillirosidinjektion			
	nach alpha-HCH-Vorbehandlung		bei unvorbeh. Kontrollen	
	Anzahl der untersuchten Tiere	Prozent	Anzahl der untersuchten Tiere	Prozent
5.	2 Krämpfe 28 keine	6,7	1 tot 1o Krämpfe 16 Lähmungen	1oo
13.	12 keine	o,o	2 tot 13 Krämpfe	1oo
14.	1 Lähmungen 2o keine	4,8	2 tot 5 Krämpfe 2 Lähmungen	1oo
2o.	21 keine	o,o	1 tot 4 Krämpfe 2 Lähmungen 1 keine	87,5
27.	6 Krämpfe 2 Lähmungen 13 keine	38	2 tot 9 Krämpfe	1oo
34.	11 Krämpfe 3 Lähmungen 7 keine	66,7	3 tot 7 Krämpfe	1oo
42.	3 tot 7 Krämpfe 3 Lähmungen	1oo	5 Krämpfe 3 Lähmungen 2 keine	8o

Tab. 8 Toxizitätsverlust von Scillirosid nach einmaliger Vorbehandlung der Versuchstiere mit alpha- Hexachlorcyclohexan

Vorbehandlung: 2oo mg/kg -HCH 2 %ig in Rapsöl i.p.
Scillirosid : o,4 mg/kg o,oo5 %ig in gummi arab.i.p.

Tiere : weiße, eibliche Ratten, 13o - 16o g

Gabe stetig nach. Am 34. Tag beantworteten bereits zwei Drittel der vorbehandelten Versuchstiere die Scillirosid-injektion mit den charakteristischen Zeichen einer Ver - giftung, während beim restlichen Drittel noch eine ausgeprägte Schutzwirkung der HCH-Vorbehandlung zu erkennen war. Am 42. Tag war keine Differenz in der Toxizität zwischen vorbehandelten und nicht vorbehandelten Versuchs - tieren mehr festzustellen.

c) Toxizitätsverlust von Scillirosid nach ß-HCH-Vorbehandlung

Eine einmalige ß-HCH-Vorbehandlung bewirkte ebenfalls eine deutliche Verringerung der Toxizität des Scillirosids, die über einen sehr langen Zeitraum zu beobachten war. Am 6.Tag nach der ß-HCH-Injektion waren 9o % der Tiere vor den typischen Krämpfen oder Lähmungen geschützt. Die volle Glykosidwirkung war an jenem Tag nur bei 2 der 2o vorbehandelten Versuchstiere erkennbar (1 Krämpfe, 1 Lähmungen), während die übrigen 1⅛ keine sichtbaren Vergiftungszeichen aufwiesen. Bei 1o unvorbehandelten Kontrolltieren, die dieser Gruppe zugeordnet waren, trat die volle Scillirosidwirkung auf. 4 Tiere waren tot und die übrigen 6 zeigten die charakteristischen Rollkrämpfe (s.Tab. 9). Wie Abb. 2 c deutlich macht, liegt das Maximum des Toxizitätsverlustes von Scillirosid zwischen dem 6. und 24. Tag nach der ß-HCH-Vorbehandlung. Später nimmt die krampfhemmende Wirkung des ß-HCH langsam wieder ab. Am 35. Tag waren noch etwa 1o % der vorbehandelten Tiere vor der Scillirosidvergiftung geschützt. Am 47. Tag war es noch ungefähr die Hälfte. Gegen das Ende der 8. Woche nach der Vorbehandlung war eine Toxizitätsminderung des Scillirosids bei noch etwa 17 % der Tiere nachweisbar. Um den 6o. - 65. Tag nach der Vorbehandlung war die Giftwirkung des Scillirosids bei vorbehandelten und unvorbehandelten Versuchstieren wieder gleich.

d) Toxizitätsverlust von Scillirosid nach gamma-HCH-Vorbehandlung.

Bei Versuchstieren, die eine einmalige Injektion von gamma-HCH erhalten hatten, war bereits am darauffolgenden Tag die Toxizität des Scillirosids soweit herabgesetzt, daß nur noch 5o % aller Versuchstiere die Scillirosidgabe mit den typischen Rollkrämpfen beantworteten. Wie Tab. 1o entnommen werden kann,

Tag nach HCH-Gabe	Vergiftungserscheinungen nach Scillirosidinjektion			
	nach ß-HCH-Vorbehandlung		bei unvorbehand. Kontrollen	
	Anzahl der untersuchten Tiere	Prozent	Anzahl der untersuchten Tiere	Prozent
6.	1 Krämpfe 1 Lähmungen 18 keine	10	4 tot 6 Krämpfe	100
12.	18 keine	0	2 tot 4 Krämpfe 3 Lähmungen	100
19.	1 tot 15 keine	6,3	2 tot 7 Krämpfe 1 Lähmungen	100
28.	1 tot 3 Krämpfe 1 Lähmungen 11 keine	31	2 tot 8 Krämpfe 2 Lähmungen	100
35.	6 Krämpfe 3 Lähmungen 24 keine	27	8 Krämpfe 9 Lähmungen	100
44.	1 tot 2 Krämpfe 2 Lähmungen 8 Keine	33,5	5 tot 5 Krämpfe	100
45.	3 Krämpfe 4 Lähmungen 9 keine	43,8	1 tot 2 Krämpfe 2 Lähmungen	100
49.	1 tot 4 Krämpfe 2 Lähmungen 6 keine	54	6 Krämpfe 4 Lähmungen	100
52.	1 tot 4 Krämpfe 4 Lähmungen 7 keine	56,4	2 tot 5 Krämpfe 2 Lähmungen	100
56.	2 tot 5 Krämpfe 3 Lähmungen 2 keine	83,3	5 tot 2 Krämpfe	100

Tab. 9 Toxizitätsverlust von Scillirosid nach einmaliger Vorbehandlung der Versuchstiere mit ß-Hexachlorcyclohexan

Vorbehandlung: 200 mg/kg ß-HCH 1%ig in Rapsöl i.p.
Scillirosid : 0,4 mg/Kg 0,005 %ig in gummi arab. i.p.
Tiere: weiße, weibliche Ratten, 130- 160 g

Tag nach HCH-Gabe	Vergiftungserscheinungen nach Scillirosidinjektion			
	nach γ-HCH-Vorbehandlung		bei unvorbehandelten Kontrollen	
	Anzahl der untersuchten Tiere	Prozent	Anzahl der untersuchten Tiere	Prozent
1.	1 tot 6 Krämpfe 9 keine	44	2 tot 9 Krämpfe 3 Lähmungen	100
2.	17 keine	0	8 Krämpfe 3 Lähmungen 2 keine	84,6
4.	1 tot 2 Krämpfe 3 Lähmungen 6 keine	50	2 tot 4 Krämpfe 2 Lähmungen 1 keine	89.0
6.	2 tot 7 Krämpfe 4 Lähmungen 1 keine	92.8	2 tot 2 Lähmungen 5 Krämpfe	100

Tab. 10 Toxizitätsverlust von Scillirosid nach einmaliger Vorbehandlung der Versuchstiere mit gamma-Hexachlorcyclohexan

Vorbehandlung: 60 mg/kg γ-HCH 1,2 %ig in Rapsöl i.p.
Scillirosid: 0,4 mg/kg 0,005 %ig in gummi arab. i.p.
Tiere: weiße, weibliche Ratten, 130 -160 g

war an diesem Tag von den 16 vorbehandelten Versuchstieren eines tot, 6 zeigten Krämpfe, 9 waren geschützt, während sich bei den zugeordneten Kontrolltieren die Scillirosidwirkung voll erkennen ließ. Von 14 Versuchstieren waren 2 tot, 9 wiesen Krämpfe auf und 3 Lähmungen. Am nächstfolgenden Tag, dem 2. nach der Vorbehandlung, umfaßte die krampfhindernde Wirkung des gamma-HCH alle vorbehandelten Versuchstiere, so daß keines von ihnen die Zeichen der schweren Scillirosidvergiftung aufwies. Wie Abb. 3 c zeigt, ließ der toxizitätsmindernde Einfluß der gamma-HCH-Injektion sehr schnell wieder nach. Am 4. Tag war die Txizität des Scillirosids nur noch bei etwa der Hälfte der vorbehandelten Tiere vermindert. Von 12 vorbehandelten Versuchstieren war eins tot, 2 ließen Krämpfe erkennen, 3 Lähmungen und die restlichen 6 leichte Vergiftungserscheinungen. Zwischen dem 6. und 7. Tag nach der Vorbehandlung war die Empfindlichkeit gegenüber Scillirosid bei unvorbehandelten und vorbehandelten Versuchstieren so gut wie gleich. Zu einem späteren Zeitpunkt ließ sich kein Unterschied mehr finden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden:
Die drei getesteten HCH-Isomeren entfalten alle eine starke antikonvulsive Wirksamkeit gegenüber Scillirosid.
Diese war nach einer alpha-HCH-Gabe zwischen dem 6.und 2o. Tag, nach beta-HCH-Applikation zwischen dem 8. und 24. Tag und nach gamma-HCH-Injektion am 2. Tag maximal ausgeprägt.
Alpha-HCH verminderte die Toxizität von Scillirosid etwa 42, beta-HCH 6o- 65 und gamma-HCH 6- 7 Tage nach der Vorbehandlung.

Toxizitätsverlust von Cardiazol nach einmaliger, intraperitonealer HCH- Vorbehandlung

Frühere Versuche von Herken u. Mitarbeitern (s.S.4) hatten ergeben, daß Cardiazol seine krampfauslösende Wirkung verliert, wenn es Versuchstieren injiziert wird, die einmalig mit Hexachlorzyklonexanen vorbehandelt worden waren. "Doch sprachen verschiedene Beobachtungen dafür, daß der zeitliche Ablauf der Wirkung der HCH nach oraler und intraperitonealer Gabe nicht gleich ist, wenn der krampfhindernde Effekt als Test für die Wirkung zugrundegelegt wird." (Coper, Herken u. Klempau 20)
Um aber einen Vergleich anstellen zu können zwischen der krampfhemmenden Wirkung der HCH und der Beschleunigung des Abbaues von Evipan und Mintacol, war es notwendig, den Verla-uf und die Intensität der Krampfhemmung gegenüber Cardiazol unter den gleichen Bedingungen zu testen.
Es wurden deshalb weiße, weibliche Ratten mit einer einmaligen, intraperitonealen Injektion der HCH vorbehandelt. (Dosis s.S. 8). Cardiazol wurde in der von Herken angegebenen Dosis von 80 mg/kg in wassriger Lösung subcutan injiziert. Diese Dosierung ist ausreichend, um bei allen nicht vorbehandelten Tieren des Kollektivs einen tonisch- klonischen Krampfa-nfall auszulösen.

Toxizitätsverlust von Cardiazol nach alpha-HCH-Vorbehandlung

Der Einfluß einer einmaligen, intraperitonealen Applikation von alpha- HCH zeigte sich darin, daß die krampfauslosende Wirkung des Analepticums schon bald nach der Vorbehandlung eine Abschwächung erfuhr. Diese nahm in den folgenden Tagen weiter zu und war am 4. Tag nach der Vorbehandlung, wie Abb- 1 c zeigt, am größten. Zu diesem Zeitpunkt blieben etwa 75 % der Versuchstiere ohne die charakteristischen Krampfanfälle. So rasch, wie sich die antikonvulsive Wirkung des alpha- HCH einstellte, klang sie auch wieder ab. Am 9. Tag nach der Vorbeha-ndlung war bei fast allen Tieren die volle Cardiazolwirkung wieder zu erkennen (Koransky unveröff. Versuche).

b)Toxizitätsverlust von Cardiazol nach ß-HCH-Vorbehandlung

Eine einmalige, intraperitoneale Gabe von ß-HCH bewirkte ebenfalls eine Krampfhemmung gegenüber Cardiazol. Sie trat bald nach der Vorbehandlung auf, nahm in den folgenden Tagen stark zu und ließ zwischen dem 3. und 9.Tag nach der Vorbehandlung einen Höhepunkt erkennen.Obwohl die in diesem Zeitraum erhaltenen Werte stark schwanken, ist aus ihrer Gesamtheit doch zu erkennen, daß etwa zwei Drittel der vorbehandelten Versuchstiere vor den charakteristischen Krampfanfällen geschützt waren. Mit Beginn der zweiten Woche nach der Vorbehandlung verringerte sich die antikonvulsive Wirkung des ß-HCH wieder langsam (s.Abb.2c). Am 14. Tag trat bei etwa 7o % der vorbehandelten Versuchstiere die volle Cardiazolwirkung wieder zutage, am 21. Versuchstag bei etwa 9o % von ihnen. Zu einem späteren Zeitpunkt war keine Differenz in der Toxizität des Cardiazols zwischen vorbehandelten und unvorbehandelten Versuchstieren mehr zu finden. Eine subcutane Injektion von 8omg/kg Cardiazol löste bei allen Tieren einen tonisch-klonischen Krampfanfall aus.

C)Toxizitätsverlust von Cardiazol nach γ-HCH-Vorbehandlung

Eine einmalige gamma-HCH-Applikation zeigte gegenüber Cardiazol auch eine lange anhaltende antikonvulsive Wirkung. Diese setzte wie nach alpha- und beta-HCH-Vorbehandlung unmittelbar nach der HCH-Injektion ein.Am zweiten Tag wurde etwa die Hälfte der Versuchstiere vor den Cardiazolkrampfanfällen geschützt. Diese Schutzwirkung der HCH-Gabe erreichte zwischen dem 4. und 7. Tag ihren Höhepunkt, an dem ungefähr 6o % der Versuchstiere die Cardiazolgabe nicht mit Krampfanfällen beantworteten. Danach nahm die krampfhemmende Wirkung des gamma-HCH wieder ab. Am 7. Tag reagierten noch 1o von 16, am 11. Tag 4 von 16 und am 14. Tag nur noch eines von 16 nicht mit Krämpfen.(s.Tab.12). Zu einem späteren Zeitpunkt nach der Vorbehandlung trat stets die volle Wirkung des Analeptikums zutage.
Ein Vergleich der nach intraperitonealer HCH-Applikation erhaltenen Versuchsergebnisse mit denjenigen von Herken nach oraler HCH-Gabe zeigt keine prinzipiellen Unterschiede in der Krampfhemmung, nur geringe Abweichungen im zeitlichen Verlauf des Effektes.(vgl.S.4)

Tag nach HCH-Gabe	Tier-zahl	Zahl der vorbehandelten Tiere		Krampfhemmung in %
		mit Krämpfen	ohne Krämpfe	
1.	2o	5	15	75
2.	2o	11	9	45
4.	19	3	16	84
5.	19	11	8	42
7.	2o	8	12	6o
11.	17	8	9	53
14.	17	12	5	29
21.	17	15	2	12

Tab.11 Toxizitätsverlust von Cardiazol nach einmaliger Vorbehandlung der Versuchstiere mit ß-Hexachlorcyclohexan

Vorbehandlung: 2oomg/kg ß-HCH in Rapsöl 1%ig i.p.
Cardiazol: 8o mg/kg 1%ig in Aqua dest. s.c.
Tiere: weiße, weibliche Ratten, 11o- 15o g

Tag nach HCH-Gabe	Tier-zahl	Zahl der vorbehandelten Tiere		Krampfhemmung in %
		mit Krämpfen	ohne Krämpfe	
2.	17	8	9	53
4.	22	9	13	59
7.	16	6	1o	63
11.	16	12	4	25
14.	16	15	1	6

Tab. 12 Toxizitätsverlust von Cardiazol nach einmaliger Vorbehandlung der Versuchstiere mit gamma-Hexachlorcyclohexan

Vorbehandlung: 6o mg/kg γ-HCH 6 %ig in Rapsöl i.p.
Cardiazol: 8o mg/kg 1 %ig in Aqua dest. s. c.
Tiere: weiße, weibliche Ratten, 13o- 18o g

Mintacolabbau in vitro nach einmaliger HCH- Vorbehandlung

Nachdem die Stoffwechselbestimmungen in vitro ergeben hatten, daß die drei getesteten HCH- Isomeren die Barbituratoxydation durch Enzyme der Lebermikrosomen stark beschleunigen, ergab sich die Frage, ob nicht auch Mintacol, dessen Wirksamkeit durch die HCH stark vermindert wird (Coper,Herken u.Klempau 19), nach der Vorbehandlung schneller gespalten wird und dadurch seine Wirkung verliert. Diese Frage war aus folgenden beiden Gründen berechtigt: Zum einen hatte Aldridge (1) gezeigt, daß Mintacol im Organismus der Ratte vor allem durch Enzyme der Leber abgebaut wird, zum anderen hatte Remmer (78-80) den Nachweis erbracht, daß auch die Aktivität bestimmter hydrolysierender Fermente in den Lebermikrosomen durch Zufuhr körperfremder Substanzen zu erhöhen ist.
Desnalb wurden Versuchstiere mit einer einmaligen,intraperitonealen Injektion von HCH vorbehandelt und die enzymatische Hydrolyse des Mintacols in der Leber und in anderen Organen untersucht.

a) Bestimmung der Mintacolspaltung in vitro

Die Bestimmung der enzymatischen Hydrolyse von Mintacol wurde nach den Angaben von Aldridge (1) durchgeführt. Weiße, weibliche Ratten im Gewicht von 11o- 16o g wurden mit der auf S. 8 angegebenen HCH- Dosis vorbehandelt und in den darauffolgenden Tagen durch Dekapitation getötet. Nach dem Ausbluten wurden die Lebern herauspräpariert und je 2 g möglichst bindegewebsfreien Lebergewebes in 8 ml Standardlösung (77 Teile KCl-Lösung 1,1 %ig, 3 Teile Glucoselösung 5,5 %ig, 2o Teile Phosphatpuffer pH 7,6) in einem Potter- Elvehjem- Homogenisa-tor aus Plexiglas homogenisiert und anschließend 1o min. bei 0°C in einer Kühlzentrifuge (Fa. Phywe) bei 4o.ooo g zentrifugiert. Dabei trennten sich noch intakte Zellen, Mitocnondrien, Zellkerne und das Bindegewebe ab. Das überstehende Zellplasma mit den Mikrosomen diente als Enzympräparation.

Zur Messung der Hydrolyse des Mintacols pro Zeiteinheit wurden folgende Inkubationsansätze zubereitet:

1 ml Enzympräparation
1 ml Mintacollösung (3 µ Mol/ml)
3 ml Standardlösung

5 ml Inkubationsansatz

Die Inkubation der Ansätze erfolgte in 25 ml fassenden Erlenmeyerkölbchen für die Dauer von 3o Minuten unter Schütteln in einem Wasserbad von 37°C. Gasphase war Luft.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die gesamten Ansätze in 4o ml fassende Zentrifugengläser übernommen und die enzymatischen Reaktionen durch Zusatz von o,5 ml 5n HCl abgestoppt. Die Extraktion des p-Nitrophenols, das durch die hydrolytische Spaltung des Mintacols gebildet worden war, erfolgte durch 1o ml eines aus gleichen Teilen bestehenden Gemisches von n-Butanol und Toluol. Die mit Schliffstopfen verschlossenen Gläser rotierten dazu 15 Minuten lang auf einem Gestell, wobei mehr als 95 % des vorhandenen p-Nitrophenols, wie in Kontrollversuchen festgestellt wurde, in das Butanol- Toluol-Gemisch übergehen. Kurzes Zentrifugieren (1o min. bei 2ooo U/min.) trennte beide Phasen gut voneinander, so daß 5 ml der Butanol-Toluol-Phase abpipettiert werden konnten. Diesen 5 ml wurden noch 2 ml reinen Butanol-Toluol-Gemisches hinzugefügt und kurz vor der Messung 3 ml eines Ammoniak-Äthanol-Gemisches (1 Teil NH_3 23 %ig + 4 Teile Äthanol). Durch die Zugabe des Alkali geht p-Nitrophenol in die gelb gefärbte chinoide Form über, deren Absorption im Spektrophotometer (Fa.Beckman) bei der Wellenlänge von 4oo mu gemessen wurde. Bei dieser Wellenlänge liegt das Absorptionsmaximum einer alkalischen Lösung von p- Nitrophenol.

Zur Berechnung der Spaltungsrate wurden noch folgende Vergleichsmessungen durchgeführt:

1. Der Leerwert. Er wird vor allem durch diejenige Menge p-Nitrophenol hervorgerufen, die ohne Anwesenheit von Enzymen aus der Zugesetzten Mintacolmenge entstaht. Zu seiner Bestimmung wurde 1 ml Mintacollösung (3 µ Mol) mit 3 ml Standardlösung inkubiert

und das Homogenat erst nach Abschluß der Inkubationszeit und dem Zusatz von o,5 ml 5n HCl hinzugefügt. Die Extraktion erfolgte nach dem oben angegebenen Schema.

2. Die spezifische Extinktion von p-Nitrophenol in alkalischer Lösung. Sie beträgt unter den Bedingungen, d = 1cm, λ = 4oo mμ, c = $1.1o^{-6}$ Mol /ml, E = 17,46. (Eichkurve s. Abb.5) An Hand dieses Wertes konnte errechnet werden, daß fast das gesamte p- Nitrophenol, das bei hydrolytischer Spaltung von Mintacol entsteht, unter den angegebenen Bedingungen extrahiert wird. Der Verlust bei der Extraktion beträgt etwa 5 %, so daß der Faktor zum Ausgleich des Extraktionsverlustes etwa 1,o5 beträgt.

Die Spaltungsrate wurde mit Hilfe der folgenden Gleichung errechnet:

$$S = \frac{E_{3o} - E_{o}}{E} \cdot V \cdot F$$

S = Abbaurate

E_{3o} = Extinktion der p-Nitrophenolmenge nach 3o min. Inkubation

E_{o} = Extinktion der nicht enzymatisch gebildeten p-Nitrophenolmenge = Leerwert

V = Verdünnungsfaktor = 2o

F = Faktor zum Ausgleich des Extraktionsverlustes = 1,o5

E = spezifische Extinktion von p-Nitrophenol in alkalischer Lösung

Die Untersuchungen erfolgten zu zwei verschiedenen Jahreszeiten mit zwei Tierkollektiven verschiedenen Ursprungs. Insgesamt wurden 19o Tiere in den Versuch genommen, in der ersten Reihe der Experimente, bei der die Mintacolspaltung in der Leber geprüft wurde, 159 (1o7 HCH-vorbehandelte und 52 Kontrolltiere), in der zweiten, die den Mintacolabbau in den einzelnen Organen zum Ziel hatte, waren es 31 Tiere (17 alpha-HCH-vorbehandelte und 14 unvorbehandelte Kontrollen). Bei jedem Versuchsansatz wurden neben den Lebern 3 - 5 HCH-vorbehandelter Tiere gleichzeitig auch diejenigen von 3 unvorbehandelten Kontrolltieren des gleichen Kollektivs mit aufgearbeitet.

Abb. 5: Eichkurve p-Nitrophenol in Alk. Lösung
E = 17.46
c = 1.10-5 Mol/ml
d = 1 cm
λ = 400 mμ
Extinktion bei λ = 400 mμ
10-5 Mol/l p-Nitrophenol

b) Mintacolabbau bei unvorbehandelten Kontrolltieren

Es zeigte sich, daß der Mintacolabbau bei den beiden Tierkollektiven nicht gleich war. Bei 52 Kontrolltieren der ersten Serie konnte ein mittlerer Abbau von $64,9 \pm 16,4 \cdot 10^{-8}$ Mol und bei 15 Tieren der zweiten ein Abbau von $102 \pm 19,9 \cdot 10^{-8}$ Mol festgestellt werden, wenn Mikrosomenenzyme aus 0,2 g Frischleber 30 Minuten mit $300 \cdot 10^{-8}$ Mol Mintacol inkubiert werden. Die Mikrosomenpräparationen der unvorbehandelten Kontrolltiere haben also in der gewählten Inkubationszeit zwischen 21,6 und 34 % der zugesetzten Mintacolmenge abgebaut.

c) Beschleunigung der Mintacolspaltung durch alpha-HCH-Vorbehandlung

Bei Versuchstieren,die eine einmalige alpha-HCH-Applikation erhalten hatten, war in den Tagen nach der Vorbehandlung eine deutliche Steigerung der hydrolytischen Spaltung des Mintacols durch Enzyme der Lebermikrosomen festzustellen. (Abb.1 d). Bereits 24 Stunden nach der HCH-Injektion zeigte sich in der Mikrosomenfraktion der Lebern dieser Tiere eine um 20 % beschleunigte biochemische Umwandlung von Mintacol. Dieser Unterschied nahm, wie Tab. 13 zu entnehmen ist,in den folgenden Tagen weiter zu und war zwischen dem 3. und 5. Tag nach der Vorbehandlung am größten. Die Lebermikrosomenenzyme vorbehandelter Tiere spalteten in diesen Tagen pro Zeiteinheit etwa 80 % mehr Mintacol, und zwar zwischen 112 und $122 \cdot 10^{-8}$ Mol, während es bei den unvorbehandelten Kontrolltieren nur $64,9 \cdot 10^{-8}$ Mol waren. Nach dem 5. Tag begann der Einfluß des alpha-HCH auf den Mintacolabbau wieder nachzulassen. Betrug die Abbausteigerung am 8. Tag noch 62 % der Norm, so war sie nach dem 13. bis 15. Tag nach der Vorbehandlung abgeklungen.

Tag nach HCH-Gabe	Tier-zahl	Mintacolspaltung nach α-HCH-Vorbehandlung	
		in 10^{-8} Mol	in % unvorbehand.Kontrollen
Kontr.	52	64.9 ± 10,6	100 ± 16,4
1.	6	76.8 ± 19.1	118 ± 29,4
2.	2	102,3 ± 14.7	158 ± 22,7
3.	3	112,0 ± 6.6	173 ± 10,2
4.	6	121,8 ± 12.7	188 ± 21.2
8.	3	105,0 ± 5.2	162 ± 8.0
9.	2	91.3 ± 2.7	141 ± 4.2
10.	4	90.5 ± 3.2	139 ± 4.9

Tab. 13 Mintacolspaltung in vitro durch Lebermikrosomenenzyme nach einmaliger alpha-HCH-Vorbehandlung

Substrat: 300.10^{-8} Mol Mintacol
Enzym : Homogenat aus 0,2 g Frischleber
Inkubation: 30 min. bei 37°C

d) Beschleunigung der Mintacolspaltung durch ß-HCH-Vorbehandlung

Bei 29 beta-HCH-vorbehandelten Versuchstieren wurde im Zeitraum vom 1. -29. Tag nach der HCH-Applikation ein gesteigerter Mintacolabbau durch Enzyme der Lebermikrosomen festgestellt. Betrug die Steigerung der Abbaurate nach 24 Stunden etwa 20 %, so waren es am 3. Tag nach der Vorbehandlung etwa 80 %. Zwischen dem 4. und 7. Tag nach der ß-HCH-Gabe ist, wie Abb.2d zeigt, das Maximum des HCH Einflusses auf die hydrolytische Spaltung des Mintacols durch Lebermikrosomenenzyme erkennbar. Die 4 vorbehandelter Versuchstiere wiesen einen um etwa 80 % beschleunigten Mintacolabbau auf, und zwar von 64,9.10^{-8} Mol bei den Kontrollen auf etwa 117.10^{-8} Mol. Nach dem 8. Tag begann sich diese Differenz wieder langsam zu verringern. Sie betrug am 14. Tag noch ungefähr 60 % und zu Beginn der 4. Woche nach der Vorbehandlung rund 20 %. Wie Abb. 2 d darstellt, ist der ß-HCH-Einfluß auf die biochemische Umwandlung des Mintacols um den 30. Tag nach der Vorbehandlung vollständig erloschen.

Tag nach HCH-Gabe	Tier-zahl	Mintacolspaltung nach ß-HCH-Vorbehandlung	
		in $1o^{-8}$ Mol	in % unvorbeh.Kontrollen
Kontr.	52	64,9 ± 1o,6	1oo ± 16,4
1.	6	77,1 ± 9,3	119 ± 14,3
3.	3	1o7,o ± 6,7	165 ± 1o,3
4.	7	115,8 ± 15,5	178 + 23,8
5.	3	117,o ± 48,8	181 ± 75,4
7.	3	118,3 ± 1o,1	183 ± 15,6
9.	2	1o7,2 ± 1,6	165 ± 2,5
1o.	3	1o8,7 ± 12,1	168 ± 18,7
11.	3	94,6 ± 8,8	146 ± 13,6
14.	3	1o4,5 ± 22,5	161 ± 34,7
17.	3	1o2,3 ± 3,6	158 ± 1o,2
22.	3	8o,5 ± 4,6	124 ± 7,1

Tab. 14 Mintacolspaltung in vitro durch Lebermikrosomenenzyme nach einmaliger ß-HCH-Vorbehandlung

Substrat : 3oo.$1o^{-8}$ Mol Mintacol
Enzym : Homogenat aus o,2 g Frischleber
Inkubation: 3o min. bei 37°C

e) Beschleunigung der Mintacolspaltung durch gamma-HCH-Vorbehandlung

Eine einmalige, intraperitoneale gamma-HCH-Gabe bewirkte ebenfalls eine Beschleunigung der enzymatischen Spaltung des Mintacols durch die Lebermikrosomen. Die Steigerung der biochemischen Umwandlung des Cholinesterasegiftes ließ sich bei 41 gamma-HCH-vorbehandelten Versuchstieren zwischen dem 1. und 12. Tag nach der Vorbehandlung nachweisen.(s.Tab. 15)

Bereits 24 Stunden nach der HCH-Gabe spalteten die Lebermikrosomenpräparationen dieser Tiere gut 6o % mehr Mintacol pro Zeiteinheit. Am 3. Tag waren es fast 8o %. Wie Abb. 3d darstellt, liegt zwischen dem 4. und 6. Tag nach der Vorbehandlung die größte HCH-Wirkung auf die enzymatische Hydrolyse des Mintacols, dessen Abbau um etwa 9o% erhöht gefunden wurde. Es wurden statt 64,9.$1o^{-8}$ Mol Mintacol bei den Kontrollen ca. 125.$1o^{-8}$ Mol durch die Lebern gamma-HCH-vorbehandelter Tiere pro Zeiteinheit hydrolysiert. Diese Differenz verkleinert sich in den folgenden Tagen rasch. Sie betrug am 9. Tag nach der Vorbehandlung noch rund 5o % und am 12. Tag noch 3o %. Wie aus Abb.3d

hervorgeht, ist die gamma-HCH-Wirkung auf die Mintacolspaltung zu Beginn der dritten Woche nach der Applikation erloschen.

Tag nach HCH-Gabe	Tierzahl	Mintacolspaltung nach γ-HCH-Vorbehandlung	
		in 10^{-8} Mol	in % unvorbeh. Kontrollen
Kontr.	52	64,9 ± 10,6	100 ± 16,4
1.	6	105,8 ± 19,9	163 ± 30,6
2.	5	99,5 ± 44,5	153 ± 68,5
3.	7	115,0 ± 11,9	178 ± 18,4
4.	8	126,8 ± 10,1	195 ± 15,5
5.	3	126,0 ± 9,1	194 ± 14,0
9.	4	100,0 ± 14,1	154 ± 21,6
11.	4	66,6 ± 13,1	103 ± 20,4
12.	4	84,2 ± 5,8	130 ± 8,9

Tab. 15 Mintacolspaltung in vitro durch Lebermikrosomenenzyme nach einmaliger gamma-HCH-Vorbehandlung

Substrat: 300.10^{-8} Mol Mintacol
Enzym : Homogenat aus 0,2 g Frischleber
Inkubation: 30 min. bei 37 °C

Vergleicht man die Wirkung der drei HCH-Isomeren auf die enzymatische Spaltung des Mintacols miteinander, so ergibt sich folgendes Bild :

Die Geschwindigkeit der Mintacolspaltung durch Präparationen der Lebermikrosomen wird durch die drei HCH-Isomeren annähernd gleich stark erhöht, nach der Vorbehandlung mit alpha-HCH um ca. 80 %, mit ß-HCH auch um etwa 80 % und mit gamma-HCH bis zu 95 % der Norm.

Der stärkste Einfluß der HCH auf die Mintacolspaltung ist nach alpha-HCH-Gabe zwischen 3. und 5. Tag, nach ß-HCH zwischen 4. und 8. Tag und nach gamma-HCH zwischen dem 4. und 6. Tag zu beobachten.

Die Dauer des Effektes beträgt für alpha-HCH und gamma-HCH etwa 14 Tage und für das beta-Isomer ungefähr die doppelte Zeit.

f) Mintacolabbau in einzelnen Leberzellfraktionen

Zum Nachweis, daß Mintacol durch Enzyme, die in den Lebermikrosomen lokalisiert sind, abgebaut wird, wurde die Geschwindigkeit der Mintacolspaltung in Gesamthomogenat, isolierten Lebermikrosomen und im Leberzellplasma vergleichend untersucht.

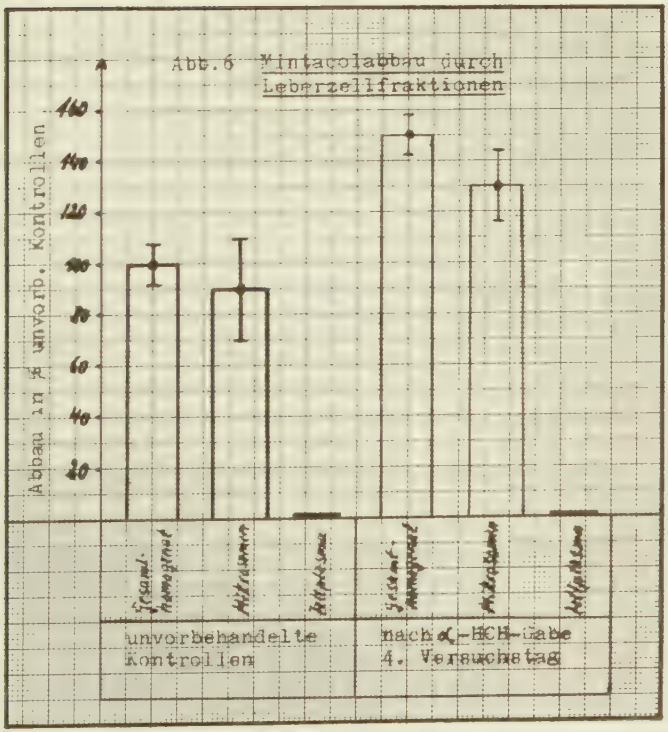
Die Mikrosomen wurden aus dem nach obigen Angaben zubereiteten Homogenat in einer Ultrazentrifuge (Fa. Spinco) abgetrennt. Dazu wurde das Homogenat 6o Minuten bei loo.ooo g und 0^{o} C zentrifugiert. Die Mikrosomen sedimentierten, so daß das überstehende Zellplasma abgegossen und die Mikrosomen in 8 ml Standardlösung resuspendiert werden konnten. Anschließend wurden in der oben beschriebenen Weise die Inkubationsansätze hergestellt und mit Gesamthomogenat, Zellplasma und der Mikrosomensuspension als Enzympräparation beschickt. Nach der Inkubation und Extraktion ergab sich folgender Befund:

1. Im Gesamthomogenat zeigte sich die in Tab. 16 angegebene Spaltungsrate. Die alpha-HCH-vorbehandelten Versuchstiere wiesen einen um 51 % gesteigerten Mintacolabbau auf.
2. In den Ansätzen mit Leberzellplasma als Enzympräparation konnte keine hydrolytische Spaltung des Cholinesterasegiftes gefunden werden. In den Ansätzen mit dem Zellplasma der alpha-HCH-vorbehandelten Versuchstiere fand sich ebenfalls kein Abbau.
3. In der Mikrosomenaufschwemmung ist der Mintacolabbau sowohl bei den vorbehandelten als auch bei den nicht vorbehandelten Tieren so groß wie im Gesamthomogenat. Zwischen 85 und 9o % der Aktivität des Gesamthomogenats konnten hier wiedergefunden werden. Ebenso zeigte sich hier die Steigerung der Abbaurate nach alpha-HCH-Vorbehandlung.(s.Tab. 16).

	Mintacolspaltung in vitro durch		
	Gesamthomogenat	isolierte Mikrosomen	Zellplasma
Kontrollen	loo ± 6,7	89,9 ± 19,3	nicht nachweisbar
nach α-HCH	151 ± 7,9	129,5 ± 13,4	nicht nachweisbar

Tab. 16 Mintacolspaltung durch Zellfraktionen der Leber nach alpha-HCH-Vorbehandlung (4.Tag)

Der Mintacolabbau durch Gesamthomogenat unvorbehandelter Versuchstiere wurde = loo gesetzt. Er entsprach den in Tab. 13 angegebenen Werten.



g) Mintacolabbau in verschiedenen Organen nach alpha-HCH-Vorbehandlung

Weiterhin wurde geprüft, in welchem Ausmaß Mintacol in den übrigen Organen gespalten wird und ob HCH auch dort Veränderungen in der Geschwindigkeit der biochemischen Umwandlung des Cholinesteraseg iftes hervorrufen kann. Die Versuche wurden am 4. Tag nach einer alpha-HCH-Vorbehandlung durchgeführt. Dabei wurden neben den Lebern HCH-vorbehandelter Versuchstiere und unvorbehandelter Kontrollen auch deren Serum, Nieren, Herzmuskel, Gehirn und Milzen in der oben angeführten Weise als Enzympräparation aufgearbeitet.
Es zeigte sich außerhalb der Leber nur noch im Serum ein vergleichbarer Mintacolabbau. Er wird, wie in Tab. 17 dargestellt, durch die alpha-HCH-Vorbehandlung nicht gesteigert. Im Gehirn und in der Milz war weder bei vorbehandelten noch bei unvorbehandelten Versuchstieren eine Spaltung des Mintacols nachzuweisen, in der Niere und im Herzmuskel dagegen eine geringe, die durch die HCH-Gabe keine deutliche Steigerung erfuhr.

untersuchtes Organ	Tierzahl Kontr./HCH	Mintacolspaltung in 10^{-8} Mol unvorbeh.Kontr.	α-HCH-vorbeh.
Leber	12 / 14	102,0 ± 19,8	151,0 ± 23
Serum	12 / 14	71,0 ± 7,9	72,0 ± 16,6
Milz	6 / 6	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar
Niere	9 / 9	3,3 ± 3,1	4,6 ± 1,7
Herzmuskel	9 / 9	3,2 ± 5,5	3,5 ± 3,0
Gehirn	3 / 3	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar

Tab.17 Mintacolspaltung durch Enzympräparationen verschiedener Organe nach alpha-HCH-Vorbehandlung

Enzym: Homogenat aus 0,2 g Organgewebe
Substrat: 300.10^{-3} Mol Mintacol
Inkubation: 30 min. bei 37° C
Versuchstag: 4. Tag nach alpha-HCH-Gabe

Diskussion

Bisher sind zahlreiche Versuche durchgeführt worden, um den Mechanismus der krampfhemmenden Wirkung der Hexachlorcyclohexane aufzuklären. Herken u. Mitarb. nahmen als Ursache der Krampfhemmung Änderungen biochemischer oder physiologischer Reaktionen des Nervengewebes an (18,41,42,45,46,47). Sie untersuchten deshalb die Abhängigkeit der Krampfhemmung von der Funktion einzelner Bezirke des Gehirns (45) sowie den Einfluß der HCH-Vorbehandlung auf den Stoffwechsel des Acetylcholins (48,66),die Konzentration und den Stoffwechsel der freien Nukleotide des Gehirns (23) und das System Glutaminsäure-Glutamin-γ-Aminobuttersäure.

Koransky u. Portig (58) studierten im gleichen Zusammenhang das Schicksal der HCH im tierischen Organismus. Dabei konnten sie feststellen, daß die HCH die Enzyme der Lebermikrosomen in gleicher Weise beeinflussen wie Luminal, dessen fermentaktivierende Wirkung schon länger bekannt ist (13,73,74,75,77 u.a.). Daraus ergab sich die Frage, ob ein durch HCH beschleunigter Abbau der getesteten Krampfgifte die Ursache ihres Wirkungsverlustes sein kann.

Folgend soll an Hand der bisher vorliegenden Versuchsergebnisse geprüft werden, ob diese Daten Hinweise auf den Mechanismus der Krampfhemmung geben. Dabei wird vor allem zu untersuchen sein, ob die Krampfhemmung im Zusammenhang steht mit:

1. Veränderungen im Acetylcholinstoffwechsel des Gehirns
2. Verschiebungen in den Nukleotidfraktionen des Gehirns
3. Modifikationen im Stoffwechsel von DPN und TPN
4. Veränderungen im System Glutaminsäure-Glutamin-γ-Aminobuttersäure
5. Beschleunigung des Abbaues krampfauslösender Pharmaka

ad 1

Acetylcholin ist für die Funktion erregender und hemmender Synapsen des Nervensystems von großer Bedeutung (Feldberg 35). Veränderungen des Acetylcholingehaltes

im Zentralnervensystem oder der Aktivität der Acetylcholinesterase könnten für die Entstehung der Krampfresistenz nach HCH-Applikation von Wichtigkeit sein. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß der Acetylcholingehalt des Gehirns im generalisierten Krampfanfall nach Injektion von Cardiazol oder Scillirosid oder bei Auslösung durch Elektroschock konstant gehalten wird und sich auch nach Vorbehandlung der Versuchstiere mit alpha- und beta-HCH nicht verändert (Herken u.Neubert 48). Ebenso wird die Aktivität der Acetylcholinesterase im Gehirn und im Skelettmuskel durch die HCH-Vorbehandlung weder vermindert noch vermehrt (Neubert u. Schaefer 66). Weiterhin konnten Kewitz u. Reinert (55) nachweisen, daß alpha-,beta- und gamma-HCH wohl Cardiazolkrämpfe aufheben können, beta-HCH allein aber nur in der Lage ist, elektrisch induzierte Krämpfe zu verhindern. Die Autoren schlossen daraus, daß es sich bei der Krampfhemmung"unmöglich um eine Beeinflussung von Faktoren ganz allgemeiner Bedeutung handeln kann, wie z.B. die stärkere oder geringere Freisetzung von Acetylcholin". Diese Annahme wurde durch die Experimente von Herken u. Neubert (48) sowie von Neubert u. Schaefer (66) gestützt. Daß beta-HCH von allen getesteten HCH-Isomeren allein elektrisch induzierte Krampfanfälle aufzuheben vermag, könnte darauf beruhen, daß diese Substanz von allen geprüften HCH-Isomeren allein eine lähmende Wirkung auf das Zentralnervensystem hat (2o,29,44,45).

ad 2

Coper, Herken u. Koransky (24) zeigten, daß Nukleotide einen Einfluß auf die Bremsung von Erregungen im Zentralnervensystem haben können. Es gelang ihnen eine bereits abgelaufene Krampfhemmung gegenüber Cardiazol durch Injektion eines bisher im Gehirn nicht nachgewiesenen Adeninnukleotids, dem Adenosintetraphosphat,wiederherzustellen. Analoge Versuche mit den physiologischen Adeninnukleotiden AMP und ADP (Coper,Herken u. Koransky 22) sowie mit ATP (Koransky 57) waren dagegen erfolglos. Dies schloß jedoch die Möglichkeit nicht aus, daß spezifische Verschiebungen in den Nukleotid-

fraktionen des Zentralnervensystems in einem ursächlichen Zusammenhang mit der Krampfhemmung stehen. Deshalb wurden die freien Nukleotide des Gehirns während des generalisierten Krampfanfalles und nach Vorbehandlung der Versuchstiere mit HCH durch Coper, Herken u. Koransky (24) untersucht. Dabei zeigten sich nach der HCH-Vorbehandlung nur geringe und keinesfalls charakteristische Verschiebungen in den Nukleotidfraktionen des Gehirns. Im generalisierten Krampfanfall nahmen die energiereichen Nukleotide zugunsten der energieärmeren ab. Gleichzeitig kam es zu einer Verminderung der Gesamtmenge der Nukleotide. Diese Veränderungen traten erst mit dem Beginn des tonisch- klonischen Krampfanfalles auf und waren bei krampfresistenten Versuchstieren nicht nachweisbar. Sie sind denjenigen Verschiebungen sehr ähnlich, die bei einer zentralen Hypoxie auftreten. So war es den Autoren nicht möglich zu entscheiden, ob die gefundenen Veränderungen durch den Krampfanfall oder durch die mit dem Krampfanfall verbundene, zentrale Hypoxie ausgelöst wurden. Diese Versuche ergaben deshalb keinen Hinweis auf den Mechanismus der Krampfhemmung.

ad 3

Experimente von Coper, Velma u. Herken (27) ergaben Anhaltspunkte dafür, daß bei der Krampfhemmung durch HCH Veränderungen im Coferment-Verhältnis von DPN und TPN auftreten. Die Autoren konnten zeigen, daß die Aktivität der DPN und TPN spaltenden Nukleosidase des Gehirns bei ausgeprägter Krampfresistenz gegenüber Cardiazol erhöht ist, bei nicht resistenten Versuchstieren dagegen unverändert bleibt. Nikotinsäureamid, welches die Nukleosidase des Gehirns zu hemmen vermag, (Coper 25,26) kann die antikonvulsive Wirkung der HCH gegenüber Cardiazol aufheben (Coper 25), Isonikotinsäurehydrazid jedoch, das die Aktivität der Nukleosidase ebenfalls einschränkt, hat keinen Einfluß auf die HCH-Wirkung (Coper 25). Dieses Ergebnis spricht

gegen die Ansicht, daß die Nukleosidaseaktivität und die Krampfhemmung ursächlich miteinander verknüpft sind. Ob andere, mit der antikonvulsiven Wirkung der HCH noch enger verbundene Veränderungen im Stoffwechsel der Nukleotide bestehen, müssen weitere Versuche zeigen.

ad 4

Nach Strecker (87) sollen bei bestimmten Hemmungsvorgängen im Zentralnervensystem Änderungen im System Glutamin-Glutaminsäure-γ-Aminobuttersäure auftreten. Es wurde deshalb von Ghazal (38) untersucht, ob bei der Ausbildung der Krampfresistenz veränderte Reaktionen in diesem System nachzuweisen sind. Er fand nach Vorbehandlung der Versuchstiere mit gamma-HCH keine wesentlichen Veränderungen in den Konzentrationen der einzelnen Bestandteile dieses Systems mit Ausnahme des Glutamins. Die Konzentration dieser Substanz im Gehirn war um so höher, je stärker die antikonvulsive Wirkung des gamma-HCH nachzuweisen war. Ghazal nimmt einen durch HCH erhöhten Umsatz von Glutaminsäure und Glutamin an. Das Gehirn würde dadurch in einem verstärkten Maß vor einer Intoxikation durch Ammoniak, das selbst Erregungen auslösen kann (Richter u. Dawsen 82), geschützt sein. Nach Meinung des Autors kann die Frage, ob dieses System an den biochemischen Reaktionen bei der Krampfhemmung beteiligt ist, nur durch Umsatzbestimmungen von Glutaminsäure und Glutamin entschieden werden.

ad 5

Bei Prüfung der antikonvulsiven Wirkung der HCH hatte sich gezeigt, daß zahlreiche Krampfgifte, die sich in ihrer chemischen Struktur, ihrem Angriffspunkt im Organismus und in ihrer Wirkungsweise sehr unterscheiden, einen Wirkungsverlust erfahren (s.S.4). Dies läßt darauf schließen, daß die HCH in solche Reaktionen eingreifen, die bei der Wirkung aller getesteten Pharmaka eine Rolle spielen. Hierbei kommen sowohl Reaktionen innerhalb des Zentralnervensystems in Frage als auch solche, die bei dem Stoffwechsel der Krampfgifte in der Peripherie ablaufen. Hier ist vor allem an die in den Lebermikrosomen lokalisierten Enzymreaktio-nen zu denken, durch

die zahlreiche körpereigene wie auch körperfremde Substanzen entgiftet werden (2,4,16,17,61,64 u.a.).Diese Enzyme zeichnen sich durch besondere Eigenschaft aus, daß ihre Aktivität durch eine große Zahl körpereigener und körperfremder Stoffe stark zu beschleunigen(Remmer 76,78) oder zu verzögern (3,15,36,65) ist.
Daß die HCH die Aktivität dieser mikrosomalen Fermente erhöhen, ergab die Prüfung der narkotischen Wirkung von Evipan und Eunarkon. Alpha-, beta- und gamma-HCH reduzierten die narkotische Wirkung dieser Barbiturate stark. Der zeitliche Verlauf dieser Wirkung ist für die einzelnen HCH-Isomeren charakteristisch, die lange Dauer des Effektes möglicherweise durch das lange Verweilen der Chlorkohlenwasserstoffe im Organismus bedingt, das beim alpha-HCH ca. 4o und beim gamma-HCH etwa 2o Tage beträgt (Koransky, Portig u.Münch 59). Daß die Verringerung der Narkosezeit durch eine beschleunigte biochemische Umwandlung des Evipans hervorgerufen wird, bestätigten die Bestimmungen der Enzymaktivität in vitro. Diese zeigten, daß alpha-, beta- und gamma-HCH die Metabolisierung des Evipans durch Fermente der Lebermikrosomen nahezu verdoppeln. Dies macht es unwahrscheinlich, daß eine verminderte Empfindlichkeit des Zentralnervensystems für die Reduktion der narkotischen Wirkung verantwortlich ist. Dann hätte die kürzere Narkosezeit mit einer gleichbleibenden Abbaurate einhergehen müssen. Es zeigte sich jedoch, daß die Verkürzung der Narkose mit der Beschleunigung der Evipanoxydation parallel geht.

Eine weitere Parallelität zwischen der Mikrosomen-aktivierenden Wirkung der HCH und dem Wirkungsverlust zentral angreifender Pharmaka ergibt sich aus der Beobachtung der Latenzzeit, die sowohl bis zum Eintritt der Narkosezeitverkürzung als auch bis zur Ausbildung der vollen Krampfresistenz verstreicht. Dieses Zeitintervall zwischen der Applikation der Substanz und dem Auftreten der Wirkung tritt bei allen bisher beobachtetten Enzyminduktionen (Remmer u. Merker 8o,81) zutage. Diese Latenzzeit wird von zahlreichen Autoren zwischen 24 und 96 Stunden angegeben (53, 73,74,84 u.a.).

Aus den durchgeführten Untersuchungen ging deutlich hervor, daß die verringerte Wirkung des Evipans auf einer beschleunigten biochemischen Umwandlung beruht. Ob auch die Wirkungsverminderung von Scillirosid und Cardiazol auf eine beschleunigte Metabolisierung zurückzuführen ist, ist sehr viel schwerer nachzuweisen. Dazu wäre es notwendig, den Stoffwechsel dieser Substanzen wie beim Evipan in vitro zu erfassen.
Der Stoffwechsel des Scillirosids ist aber noch nicht aufgeklärt. Auf Grund der strukturellen Verwandtschaft dieses Glykosids aus der roten Meerzwiebel mit den Gallensäuren und Steroiden des tierischen Organismus (Stoll u.Renz 86) wäre es denkbar, daß auch diese Substanz wie die körpereigenen Strukturverwandten in der Leber abgebaut wird. Daß Leberenzyme tatsächlich in der Lage sind, Scillirosid zu spalten, zeigten Repke u. Lauterbach (63). Da die Autoren für ihre Versuche Lebertrockenpulver verwandten, läßt sich nichts darüber aussagen, wo die Enzyme, die Scillirosid in das Aglykon und zwei noch unbekannte Metabolite spalten, lokalisiert sind. Auf eine Beteiligung der Mikrosomenenzyme am Scillirosidstoffwechsel deutet z.B. die geschlechtsabhängige Empfindlichkeit der Versuchstiere hin, die von Winton (92), Stoll u.Renz (85), Rothlin u.Schalch (83) sowie von Dybing (31) beschrieben wurde. Nach den Angaben dieser Autoren beträgt die LD-5o für weibliche Ratten o,43 mg/kg und für männliche 2,1- 2,3 mg/kg. Ähnliche geschlechtsgebundene Wirkungsunterschiede haben auch bei einigen Barbituraten nachgewiesen werden können. Sie beruhen auf einer unterschiedlichen Stoffwechselkapazität der oxydierenden Enzyme der Lebermikrosomen bei der Ratte (Remmer 72,78, Quinn, Axelrod u.Brodie 71).
Eine weitere Abhängigkeit der Toxizität des Scillirosids von der Aktivität der mikrosomalen Fermente kommt in der unterschiedlichen Empfindlichkeit verschiedener Rattenstämme für das Glykosid zum Ausdruck. So ist z.B. die für den Stamm Wistar krampfauslösende Dosis von o,4 mg/kg, bei der fast alle Tiere überleben, für die meisten Tiere vom Stamm E-3 bereits tödlich. Wie Remmer (78) ge-

zeigt hat, ist dem entsprechend die Aktivität der oxydierenden Fermente der Lebermikrosomen bei den E-3-Tieren nur halb so groß wie beim Stamm Wistar.
Diese Tatsachen können als Hinweise gelten, daß Scillirosid in den Lebermikrosomen biochemisch umgewandelt wird. Für einen ursächlichen Zusammenhang zwischen der Aktivierung dieser Fermente und der Abnahme der Toxizität des Scillirosids sprechen folgende Befunde:
Die Krampfhemmung stellt sich nicht unmittelbar nach der Vorbehandlung ein, sondern benötigt zu ihrer Ausbildung eine Latenzzeit von mehreren Tagen. Beim gamma-HCH beträgt sie 2 und beim alpha- und beta-HCH 4-6 Tage.

Der Verlauf der Krampfhemmung gegenüber Scillirosid geht der gesteigerten Evipanoxydation annähernd parallel. Die größte Abbaubeschleunigung beim Evipan fällt mit dem maximalen Toxizitätsverlust von Scillirosid zeitlich zusammen.
Wenn eine Aktivierung der Mikrosomenenzyme tatsächlich Ursache des Toxizitätsverlustes ist, so müßte mit Substanzen, deren aktivierende Wirkung auf die Mikrosomenenzyme bekannt ist, ebenfalls eine Krampfhemmung gegenüber Scillirosid hervorgerufen werden können. Diese Frage beantworteten Koransky u.Portig (60). Sie zeigten, daß eine Vorbehandlung der Versuchstiere mit Luminal, Butazolidin, Coramin sowie mit DDT eine Krampfhemmung zur Folge hat.
Bekanntlich kann man die Reaktionen in den Lebermikrosomen durch Injektion der Phenylessigsäurederivate CFT-12ol (65) oder SKF- 525 A (3,15,36) hemmen. Man müßte dann erwarten, daß die Krampfhemmung gegenüber Scillirosid nicht eintritt. Tatsächlich konnte nachgewiesen werden, daß die Toxizitätsminderung des Scillirosids dann ausbleibt, wenn man bei vorbehandelten Versuchstieren die Aktivität der oxydierenden Enzyme der Lebermikrosomen durch Injektion von CFT - 12ol hemmt (Koransky u.Portig 60).

Es ist nicht nur möglich, die Aktivität vorhandener Enzyme zu vermindern, auch die Steigerung ihrer Aktivität, die sich unter der Wirkung induzierender Stoffe einstellt, läßt sich durch Applikation von Äthionin verhindern (Kato et al. 54, Fujimoto u.Plaa 37). Es müßte sich zeigen,daß eine Äthioningabe vor der HCH-Vorbehandlung die Ausbildung einer Krampfresistenz verhindert. Auch hier konnte nachgewiesen werden, daß eine der HCH-Gabe vorausgehende Injektion von Äthionin die Ausbildung einer Krampfresistenz gegenüber Scillirosid verhindert (Koransky u. Portig 60).

Es wäre auch möglich, daß HCH auf die Scillirosidkrämpfe in ähnlicher Weise wirkt wie die verschiedenen Hydantoinverbindungen. Nach Rothlin u. Schelch (83) können Hydantoine die für Scillirosid charakteristischen Rollkrämpfe unterdrücken. Gegen einen gleichartigen Wirkungsmechanismus der HCH spricht, daß die krampfhemmenden Substanzen, vor allem gamma-HCH, Coramin und DDT nicht wie die Hydantoine lähmend auf das Zentralnervensystem wirken, sondern eher wie Scillirosid erregend.

Da beim Scillirosid alle Befunde dafür sprechen, daß die Krampfresistenz durch eine beschleunigte biochemische Umwandlung des Glykosids verursacht wird, war es naheliegend,auch beim Cardiazol einen solchen Wirkungsmechanismus zu suchen. Die erhaltenen Befunde sprechen hier jedoch nicht so eindeutig für die geäußerte Ansicht. Besonders schwierig wird die Beurteilung der Frage dadurch, daß über den Stoffwechsel des Cardiazols wenig bekannt ist. Es gibt jedoch einige Hinweise darauf, daß Cardiazol in der Leber entgiftet wird.

So konnte nachgewiesen werden, daß eine Leberschädigung mit Phosphor oder Tetrachlorkohlenstoff den Schwund des Cardiazols im Organismus stark verzögert (Tatum u.Kozelka 89). Eine Einschränkung der enzymatischen Leistungen der Lebermikrosomen durch diese Lebergifte wiesen Herken, Maibauer u. Neubert (50) nach. Nach einer Hepatektomie nimmt die Konzentration des Cardiazols im Körper und damit seine zentrale Wirkung sehr viel langsamer ab (Esplin u. Woodbury 34), während eine Nephrektomie keinen Einfluß

auf seine Wirkungsdauer hat (Esplin u. Woodbury 34, Tatum u. Koselka 89). Letzteres erscheint verständlich, da unverändertes Cardiazol nur in Spuren durch die Nieren ausgeschieden wird (Esplin u. Woodbury 34, Tatum u. Kozelka 89).

Vergleicht man den durch die HCH beschleunigten Stoffwechsel von Evipan oder Mintacol mit dem Toxizitätsverlust von Cardiazol, so fällt bei allen Prozessen die mehrtägige Latenzzeit auf, die zur Ausbildung der vollen HCH- Wirkung notwendig ist, Wahrend dieser Zeit geht die mikrosomenaktivierende Wirkung der Chlorkohlenwasserstoffe der antikonvulsiven gegenüber Cardiazol parallel. Später verläuft die Krampfhemmung nicht mehr der gesteigerten Evipanoxydation parallel wohl aber in einem gewissen Ausmaß der gesteigerten Mintacolspaltung. Diese Abweichung im Verlauf könnte dadurch zustandekommen, daß andere Fermentsysteme an der Entgiftung beteiligt sind und daß diese Fermentsysteme unterschiedlich aktiviert werden.

Es gibt jedoch Befunde, die dafür sprechen, daß die HCH ihre krampfhemmende Wirkung durch Angriff am Zentralnervensystem hervorrufen. Herken, Monnier, Coper und Laue (46) wiesen nach, daß die HCH auch dann Krampfhemmung hervorrufen, wenn Cardiazol intravenös injiziert wird. Es wäre schwer zu verstehen, daß sich in der kurzen Zeitspanne zwischen der Injektion und dem Einsetzen der tonisch - klonischen Krampfanfälle eine beschleunigte Entgiftung auswirken kann.

Ebenso deuten Ergebnisse elektroenzephalographischer Untersuchungen von Coper, Herken, Rosenkötter und Selbach (21) auf einen zentralen Angriffspunkt der Hexachlorcyclohexane. Diese Autoren nahmen bei beta- HCH-vorbehandelten Versuchstieren nach Injektion von Cardiazol typische Krampf-EEG auf, ohne gleichzeitig die klinischen Symptome eines Krampfanfalles beobachten zu können. Dieser Befund spricht jedoch nicht ausschließlich für eine zentrale Auslösung der Krampfresistenz.

Herken, Kewitz u.Klempau haben weiterhin nachgewiesen, daß die Krampfhemmung an die anatomische Unversehrtheit bestimmter Bezirke des Gehirns gebunden ist und bei Abtragung z.B. einer Vorderhirnhemisphäre fortfällt(45). Hier muß jedoch berücksichtigt werden, daß die Empfindlichkeit gegenüber Cardiazol und anderen konvulsiv wirkenden Pharmaka nach operativer Entfernung des motorischen Anteils der Großhirnrinde, des Lobus frontalis oder einer Hemisphäre anteigt (Drake,Seguin u.Stavraki 30). Es wäre deshalb möglich, daß diese Empfindlichkeitssteigerung das Ausbleiben der Krampfhemmung trotz Wirksamkeit der HCH bedingt.

Offenbar kann aus den vorliegenden Versuchsergebnissen nicht entschieden werden, ob eine direkte Wirkung der HCH auf das Zentralnervensystem oder eine beschleunigte Entgiftung des Analeptikums die Ursache der Krampfhemmung ist. Es ist möglich, daß hier sowohl zentrale als auch periphere Veränderungen für den Toxizitätswerlust verantwortlich sind.

Beim Mintacol dagegen, dessen krampfauslösende Wirkung nach Vorbehandlung der Versuchstiere mit alpha-, beta- oder gamma-HCH ebenfalls eingeschränkt ist (Coper,Herken u. Klempau 19), ergaben die erhaltenen Versuchsergebnisse einen gewissen Aufschluß über die Ursache der Resistenz gegenüber dieser Substanz.

Mintacol wirkt im Organismus als Hemmstoff der Acetylcholinesterase, die durch dieses Pharmakon reversibel phosphoryliert wird und dadurch ihre Aktivität verliert. Auf diese Weise häuft sich Acetylcholin in unphysiologisch großer Menge an und löst die Vergiftungssymptome aus (Wirth 92,93). Die beobachtete Wirkung der HCH könnte deshalb auf folgende Weise zustandekommen:

1. durch direkte Einwirkung auf die Acetylcholinesterase im Sinne einer Aktivierung des Enzyms
2. durch Beschleunigung der biochemischen Umwandlung des Mintacols und infolgedessen durch eine geringere Hemmung der Esterase
3. durch Beschleunigung der Reaktivierung der durch Mintacol gehemmten Acetylcholinesterase.

Wie oben (S.49) gezeigt wurde (Herken u.Neubert 48,Neubert u. Schaefer 66), erzeugen die HCH weder charakteristische Veränderungen im Acetylcholinstoffwechsel noch in der Aktivität der Acetylcholinesterase. Hier kann deshalb die Ursache der HCH-Wirkung nicht liegen.

Eine durch HCH beschleunigte Mintacolentgiftung könnte dagegen sehr wohl Ursache des Toxizitätsverlustes sein, denn es findet nach der HCH- Vorbehandlung tatsächlich eine Beschleunigung der biochemischen Umwandlung statt. Eine einmalige Vorbehandlung mit alpha-, beta- oder gamma-HCH hatte eine Steigerung der Mintacolspaltung durch Enzyme der Lebermikrosomen um 7o - 9o% der Norm ergeben.

Allerdings können auch andere Organe Mintacol spalten, jedoch in einem sehr viel geringeren Ausmaß (Aldridge 1). Dies steht in Übereinstimmung mit eigenen Ergebnissen, die eine starke Aktivität in der Leber und im Serum zeigt u, eine kaum meßbare dagegen in den übrigen Organen. Eine beschleunigte Mintacolspaltung ließ sich nur in der Leber und in einem geringen Grad in der Niere finden. Die Geschwindigkeit der Mintacolumwandlung durch Esterasen des Serums wurde durch keines der drei getesteten HCH-Isomeren erhöht. Grevier.Bell u.Kay (28), die die Ursache des Toxizitätsverlustes von Parathion suchten, fanden ebenfalls keine Erhöhung der Serumesteraseaktivität.

Die Experimente von Woltz u.Westermann (52) stützen die Ansicht, daß eine beschleunigte Mintacolentgiftung Ursache des Toxizitätsverlustes ist. Sie verglichen die zentrale Wirkung des Mintacols bei Injektion in die Vena portae und in die Vena cava. Dabei konnten sie feststellen, daß bei der Passage des Pharmakons durch die Leber die Toxizität bereits auf ein Viertel reduziert wird.

Diese Befunde schließen allerdings nicht aus, daß auch eine Reaktivierung der alkylphosphorylierten Acetylcholinesterase eine Rolle spielt. Eine durch Mintacol gehemmte Acetylcholinesterase kann durch körpereigene (Wilson 9o, Neubert,Schaefer u.Kewitz 67, Neuhoff u.Kewitz68-7o) wie auch durch körperfremde Stoffe (Wilson 91, Kewitz 56, Erdmann u.Miterb.32,33 u.a.) reaktiviert werden. Neubert u. Schaefer (66)sowie Neubert,Schaefer u.Kewitz (67)nehmen an, daß unter der Wirkung der HCH-Vorbehandlung eine Vermehrung der körpereigenen Reaktivatoren erfolgt, wodurch

der Organismus vor der Wirkung des Alkylphosphates geschützt wird. Es wäre dann zu erwarten, daß sich die durch Mintacol gehemmte Acetylcholinesterase bei HCH-vorbehandelten Versuchstieren schneller erholt als bei den unvorbehandelten Kontrolltieren. Untersuchungen von Neubert u. Schaefer (66) über die spontane Reaktivierung der gehemmten Acetylcholinesterase nach der HCH-Vorbehandlung zeigten jedoch, daß in einem Zeitraum bis zu 72 Stunden nach der Mintacolapplikation der Verlauf der Reaktivierung bei vorbehandelten Versuchstieren und bei unvorbehandelten Kontrollen annähernd parallel war. Es zeigte sich also keine schnellere Erholung, sondern nur eine Erholung, die bei den HCH-vorbehandelten Tieren von einer geringeren Hemmung der Acetylcholinesterase ausgeht.

Zusammenfassung

Durch Verabreichung von Hexachlorcyclohexan (HCH) können Versuchstiere vor der Wirkung zahlreicher Krampfgifte geschützt werden. In einer Reihe von Versuchen war nachgewiesen worden, daß die Tiere nach einmaliger Applikation der einzelnen HCH-Isomeren über einen längeren Zeitraum resistent sind gegen Cardiazol, Coramin, Strychnin, Mintacol, Parathion und Prostigmin. Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, Einblick in die Wirkungsweise der HCH zu erhalten.

Zunächst wurde geprüft, ob die HCH, wie auf Grund früherer Befunde angenommen worden war, einige in den Lebermikrosomen lokalisierte Enzyme zu aktivieren vermögen. Es zeigte sich, daß alpha-, beta- und gamma-HCH die narkotische Wirkung von Evipan und Eunarkon stark reduzieren. Dieser Effekt wird, wie in vitro durchgeführte Untersuchungen ergaben, tatsächlich durch eine Beschleunigung oxydierender Reaktionen hervorgerufen.

Unter der Wirkung der gleichen HCH-Isomeren wurde der Toxizitätsverlust von Scillirosid studiert. Es trat eine auffallende Parallelität zutage zwischen dem zeitlichen Verlauf der Krampfhemmung und dem Wirkungsverlust des Evipans bei den einzelnen Isomeren.

Alpha-, beta- und gamma-HCH beschleunigen ebenfalls die biochemische Umwandlung des Cholinesterasegiftes Mintacol. Diese Steigerung des Stoffwechsels ließ sich nur bei den Versuchen mit der Mikrosomenfraktion der Leber nachweisen. Die Geschwindigkeit der Mintacolspaltung durch Enzyme des Serums, der Niere und des Herzmuskels wurde durch die HCH nicht beeinflußt.

Der zeitliche Verlauf dieser Reaktionsbeschleunigung unterscheidet sich deutlich von dem Verlauf der durch die HCH bewirkten Veränderungen im Barbituratstoffwechsel und der Scillirosidentgiftung.

Dagegen verläuft die durch die HCH hervorgerufene Krampfresistenz gegenüber Cardiazol annähernd parallel der Beschleunigung der biochemischen Umwandlung des Mintacols.

Aus den Versuchsergebnissen wird gefolgert, daß die HCH die biochemische Umwandlung von Scillirosid und Mintacol beschleunigen und dadurch den Wirkungsverlust dieser Krampfgifte zustandebringen. Ob auch der Wirkungsverlust anderer konvulsiv wirkender Pharmaka, insbesondere der des Cardiazols, auf die gleiche Reaktionsweise zurückzuführen ist, kann an Hand der vorliegenden Versuchsergebnisse noch nicht entschieden werden.

Literatur

1. Aldridge W. N.

Serum Esterases
2. An Enzyme Hydrolysing Diethyl-p-Nitrophenylphosphate (E-6oo) and its Identity with the A-Esterase of Mammalian Sera.

Biochem. J. 53 , 117, 1953

2. Axelrod J.

An Enzyme for the Deamination of Sympathomimetic Amines: Properties and Distribution

J. Pharmacol. exptl. Therap. 11o, 2, 1952

3. Axelrod J., Reichenthal J. and B.B. Brodie

Mechanism of the Potentiating Action of ß-Diethylamino-ethyldiphenylpropylacetate

J. Pharmacol. exptl. Therap. 112, 49, 1954

4. Axelrod J.

The Enzymatic Deamination of Amphetamine (Benzedrine)

J. biol. Chem. 214, 753, 1955

5. Axelrod J.

Biochemical Factors in the Activation and Inactivation of Drugs

Arch. exp. Path. u. Pharmakol. 238, 24, 196o

6. Ball W.L.,Sinclair J.W.,Crevier M. and K. Kay

Modification of Parathions Toxicity for Rats by Pretreatment with Chlorinated Hydrocarbon Insecticides

Canad. J. Biochem. Physiol. 32, 440, 1954

7. Bethe K., Erdmann W.D., Lendle L. und G. Schmidt

Spezifische Antidotbehandlung bei protrahierter Vergiftung mit Alkylphosphaten (Paraoxon, Parathion, DFP) und Eserin am Meerschweinchen.

Arch. exp. Path. u. Pharmakol.231, 3, 1957

8. Brodie B. B.

Pathways of Drug Metabolism

J. Pharmacy a. Pharmacology (London) 8, 1, 1956

9. Brodie B.B., Burns J.J.,Mark L.C.,Lief P.A.,Bernstein E. and E.M. Papper

The Fate of Pentobarbital in Man and Dog and a Method for its Estimation in Biological Material

J. Pharmacol. exptl. Therap. 1o9, 26, 1953

1o. Brodie B.B.,La Du B.N., J.R. Gilette

Enzymatic Metabolism of Drugs and other Foreign Compounds

Ann. Rev. Biochem. 27, 427, 1958

11. Buck A.A. und L. Pfannemüller

Vergiftungen mit Hexachlorcyclohexan

Arch. Toxikologie 16 , 328, 1956/57

12. Bush M.T., T.C. Butler and H.L. Dickison

The Metabolic Fate of Evipal

J. Pharmacol. exptl. Therap. 1o8,1o4,1953

13. Conney A.H., C. Davidson, R. Castel and J.J. Burns

Adaptive Increases in Drug-Metabolizing Enzymes Induced by Phenobarbital and Other Drugs

J. Pharmacol. exptl. Therap. 13o , 1, 196o

14. Conney A.H., J.A. Michaelson and J.J. Burns

Stimulatory Effect of Chlorcyclizine on Barbiturate Metabolism

J. Pharmacol. exptl. Therap. 132, 2o2, 1961

15. Cooper J.R., J. Axelrod and B.B. Brodie

Inhibitory Effects of ß-Diethylaminomethyl-Diphenylpropylacetate on a Variety of Drug Metabolic Pathways in Vitro

J. Pharmacol. exptl. Therap. 112, 55, 1954

16. Cooper J.R. and B.B. Brodie

The Enzymatic Metabolism of Hexobarbital (Evipal)

J. Pharmacol. exptl. Therap. 114, 4o9, 1955

17. Cooper J.R. and B.B. Brodie

The Enzymatic Oxydation of Pentobarbital and Thiopental

J. Pharmacol. exptl. Therap. 12o, 75, 1957

18. Coper H., H. Herken und I. Klempau

Antagonismus und Synergismus des ß-und gamma- Hexachlorcyclohexans

klin. Wschr. 1951, 264

19. Coper H., H. Herken und I. Klempau

Wirkungsverlust krampferzeugender Pharmaka durch Hexachlorcyclohexan

Naturwiss. 1951, 69

2o. Coper H., H. Herken und I. Klempau

Zur Pharmakologie und Toxikologie chlorierter Cyclohexane

Arch. exp. Path. u. Pharmakol. 212, 463, 1951

21. Coper H., H.Herken,L.Rosenkötter und H. Selbach

Hirnelektrische Untersuchungen nach Einwirkung der krampfhindernden Hexachlorcyclohexane

klin. Wschr. 1952, 551

22. Coper H., H. Herken und W. Koransky

Wiederherstellung der krampfhindernden Wirkung der Hexachlorcyclohexane durch ein Adenosintriphosphorsäurepräparat

Naturwiss. 1954, 531

23. Coper H., H. Herken und W. Koransky

Die freien Nukleotide des Gehirns im generalisierten Krampfanfall

Arch. exp. Path. u. Pharmakol. 234, 455, 1958

24. Coper H.,H. Herken und W. Koransky

Wiederherstellung der krampfhindernden Wirkung der Hexachlorcyclohexane durch Adenosintetraphosphat

Arch. exp. Path. u. Pharmakol. 235, 464, 1959

25. Coper H.

Die Bedeutung von Nikotinsäureamid für die krampfhemmende Wirkung der Hexachlorcyclohexane

Arch. exp. Path. u. Pharmakol. 241, 194, 1961

26. Coper H.

Die Aktivität der DPN- und TPN-Nukleosidase des Gehirns nach Einwirkung verschiedener Pharmaka

Arch. exp. Path. u. Pharmakol. 242, 24, 1961

27. Coper H., J.Helge und H. Herken

Die Wirkung des Hexachlorcyclohexans auf die DPN- und TPN-Nukleosidase des Gehirns

Arch. exp. Path. u. Pharmakol. 243, 99, 1962

28. Crevier M., W.L. Ball and K. Kay

Observations on Toxicity of Aldrin
2.Serumesterase Changes in Rats Following Administration of Aldrin and Other Chlorinated Hydrocarbon Insecticides

Arch. Industrial Hygiene 9 , 3o6, 1954

29. Domenjoz R.

Kontaktgifte

Arch. exp. Path. u. Pharmakol. 2o8 , 144, 1949

3o. Drake C.G., J.J. Seguin and G.V. Stavraki

The Effects of Convulsant Agents on Partially Isolated Regions of the Central Nervous System

Canad. J. Biochem. Physiol. 34, 689, 1956

31. Dybing O.

Die Toxizität und Herzwirkung des Scillirosids

Arch. exp. Path. u. Pharmakol. 220 , 207, 1953

32. Erdmann W.D., F. Sakai und F. Scheler

Erfahrungen bei der spezifischen Behandlung einer E-605-Vergiftung mit Atropin und dem Esteraseaktivator PAM

Dtsch. med. Wschr. 1958, 1359

33. Erdmann W.D. und M. v. Clermann

Ein neuer Esteraseaktivator für die Behandlung einer Vergiftung mit Alkylphosphaten

Dtsch. med. Wschr. 1963, 2201

34. Esplin D.W. and D.M. Woodbury

The Fate and Excretion of C^{14}-labeled Pentylenetetrazol in the Rat with Comments on Analytical Methods for Pentylenetetrazol

J. Pharmacol. exptl. Therap. 118, 129, 1956

35. Feldberg W.

Acetylcholin

in Richter: Metabolism of the Nervous System
Pergamon Press London/Oxford 1957, 493

36. Fouts J.R. and B.B. Brodie

Inhibition of Drug Metabolic Pathways by the Potentiating Agent 2,4-Dichloro-6-Phenyl-Phenoxyethyl Diethylamine

J. Pharmakol. exptl. Therap. 115, 68, 1955

37. Fujimoto J.M. and G.L. Plaa

Effect of Ethionin and Carbontetrachloride on Urethan and Phenobarbital Induced Changes in Hexobarbital Action

J. Pharmacol. exptl. Therap. 131, 282, 1960

38. Ghazal A.

Zur Wirkung insektizider chlorierter Kohlenwasserstoffe auf das Zentralnervensystem von Ratten.

Arch. exp. Path. u. Pharmakol. 244, 504, 1963

39. Henschel J.

Erste Mitteilung über die Giftwirkung des Scillirosids, des Giftes der roten Meerzwiebel, an Ratten

Schädlingsbekämpfung 1950, 94

40. Herken H. und I. Klempau

Zur neurotropen Wirkung einiger Hexachlorcyclohexane

Naturwissenschaften 1950, 493

41 Herken H.

Zur Wirkung von Hexachlorcyclohexan auf das Nervensystem von Warmblütern

klin. Wschr. 1950, 582

42 Herken H.

Änderung der Zellfunktion im Nervensystem durch Hexachlorcyclohexan

Arch. exp. Path. u. Pharmakol. 211, 143, 1950

43 Herken H.

Funktionsstörungen am Nervensystem durch Hexachlorcyclohexan

Arch. exp. Path. u. Pharmakol. 212, 158, 1950

44. Herken H.

Eingriffe am Nervensystem mit Hexachlorcyclohexan

Arzneimittelforschung 1 , 356, 1951

45 Herken H., H. Kewitz und I. Klempau

Wirkungsverluste von Krampfgiften durch Hexachlorcyclohexan

Arch. exp. Path. u. Pharmakol. 215, 217, 1952

46 Herken H., M. Monnier, H. Coper und H. Laue

Hemmung subcortical ausgelöster Krampfpotentiale durch ß- Hexachlorcyclohexan

Experientia (Basel) 8 , 432 , 1952

47 Herken H.

Allobiotische Wirkungen am Zentralnervensystem

ärztl. Wschr. 1952, 545

48 Herken H. u. D. Neubert

Der Acetylcholingehalt des Gehirns bei verschiedenen Funktionszuständen

Arch. exp. Path. u. Pharmakol. 219, 223, 1953

49 Herken H.

Die freien Nukleotide des Gehirns nach Einwirkung antikonvulsiver Hexachlorcyclohexane

Vortrag Karolinska Institutet Stockholm 9.5.1957

50 Herken H., D. Maibauer und D. Neubert

Der Einfluß von Äthionin auf die Fermentsysteme in den Lebermikrosomen

Arch. exp. Path. u. Pharmakol. 233, 139, 1958

51 Holtz P., H. Balzer, E. Westermann und E. Wezler

Beeinflussung der Evipannarkose durch Reserpin, Iproniazid und biogene Amine

Arch. exp. Path. u. Pharmakol 231, 333, 1957

52 Holtz P. und E. Westermann

Giftung und Entgiftung von Parathion und Paraoxon

Arch. exp. Path. u. Pharmakol. 237, 211, 1959

53 Kato R.

Modifications of the Toxicity of Strychnine and Octomethylpyrophosphoramide (OMPA) Induced by Pretreatment with Phenaglykodol and Thiopental

Arzneimittelforschung 11 , 787, 1961

54 Kato.R., E. Chiesara and P. Vassanelli

Factors Influencing Induction of Hepatic Microsomal Drug Metabolizing enzymes

Biochem. Pharmacologie 11 , 211, 1962

55 Kewitz H. und H. Reinert

Zum Nachweis von Funktionsstörungen im Nervensystem durch elektrisch und chemisch induzierte Krämpfe

Arch. exp. Path. u. Pharmakol. 215, 93, 1952

56 Kewitz H.

Die Wiederherstellung der Cholinesteraseaktivität bei der Alkylphosphatvergiftung durch ein spezifisches Antidot

klin. Wschr. 1957 , 521

57 Koransky W.

Isolierung und Identifizierung eines Adeninnukleotids mit neurotropen Wirkungen

Arch. exp. Path. u. Pharmakol. 232, 266, 1957

58 Koransky W. und J. Portig

Der Stoffwechsel der Hexachlorcyclohexanisomeren und seine Beeinflussung durch Mikrosomen aktivierende Pharmaka

Arch. exp. Path. u. Pharmakol. 243 , 294, 1962

59 Koransky W., J.Portig und G. Münch

Resorption , Verteilung und Ausscheidung von alpha- und gamma- Hexachlorcyclohexan

Arch. exp. Path. u. Pharmakol. 244, 564, 1963

6o Koransky W. und J. Portig

Beeinflussung von Entgiftungsvorgängen durch Hexachlorcyclohexanisomere

Arch. exp. Path.u. Pharmakol. 245, 8o, 1963

61 La Du B.N., L.Gaumetou, N.Trousof and B.B. Brodie

Enzymatic Dealkylation of Aminopyrin (Pyramidon) and Other Alkylamines

J. biol. Chem. 214, 741, 1955

62 Latki G. und W.D. Erdmann

Hemmung und Reaktivierung von Cholinesterasen nach Vergiftung mit Paraoxon und DFP in vitro

Arch. exp. Path. u. Pharmakol. 240, 514, 1961

63 Lauterbach W. und K. Repke

Über die Verteilung herzglykosidspaltender Fermente im tierischen Organismus

Arch. exp. Path. u. Pharmakol. 240, 45, 1960

64 Mitoma C. and S. Udenfriend

Enzymatic Hydroxylation of Aromatic Drugs
J. Pharmacol. exptl. Therap. 113, 40, 1955

65 Neubert D. und H. Herken

Wirkungssteigerung von Schlafmitteln durch den Phenyldiallylessigsäureester des Diäthylaminoäthanols

Arch. exp. Path. u. Pharmakol. 225, 453 , 1954

66 Neubert D. und J. Schaefer

Wirkungsverlust von Diäthyl-p-Nitrophenylphosphat und Oktamethylpyrophosphoramid nach Vorbehandlung mit alpha- Hexachlorcyclohexan

Arch. exp. Path. u. Pharmakol. 233, 151, 1958

67 Neubert D., J. Schaefer und H. Kewitz

Reaktivierung der Acetylcholinesterase durch körpereigene Stoffe

Naturwissenschaften 1958, 290

68 Neuhoff V. und H. Kewitz

Reactivation of Alkylphosphorylated Cholinesterase by a Constituent of Liver

biochem. Pharmacol. Vol 8. Nr. 1 . 1961

69 Neuhoff V. und H. Kewitz

Reinigung des endogenen Reaktivators der alkylphosphorylierten Cholinesterase

Arch. exp. Path. u. Pharmakol. 241. 548. 1961

70 Neuhoff V. und H. Kewitz

Reactivation of Alkylphosphorylated Cholinesterase by a Constituent of Liver
Int. J. Neuropharmacol. 1. 169. 1962

71 Quinn G.P., J. Axelrod and B.B. Brodie

Species and Sex Difference in Metabolism and Duration of Action of Hexobarbital

Fed. Proc. 13, 296, 1954

72 Remmer H.

Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Entgiftung von Evipan und Thiopental bei Ratten

Arch. exp. Path. u. Pharmakol. 233, 173, 1958

73 Remmer H.

Beschleunigung des Evipanabbaus unter Wirkung von Barbituraten

Naturwissenschaften 1958, 189

74 Remmer H.

Der beschleunigte Abbau von Pharmaka in den Lebermikrosomen unter dem Einfluß von Luminal

Arch. exp. Path. u. Pharmakol. 235, 279, 1959

75 Remmer H.

Die Beschleunigung der Evipanoxydation und der Demethylierung von Methylaminoantipyrin durch Barbiturate

Arch. exp. Path. u. Pharmakol. 237, 296, 1959

76 Remmer H.

Drugs as Activators of Drug Enzymes

Biochem. Pharmacol. 8 , 138, 1961

77 Remmer H., M. Siegert und H.W. Liebenschütz

Die Beschleunigung der Oxydation von Arzneimitteln während und nach Behandlung mit Luminal

Klin. Wschr. 1961, 490

78 Remmer H.

Hemmung und Steigerung mikrosomaler Oxydation durch körpereigene und körperfremde Stoffe

Symposion der gemeinsamen Tagung der Deutschen Gesellschaft für Physiologische Chemie und der Österreichischen Biochemischen Gesellschaft Wien 1962 S. 75

79 Remmer H.

Beschleunigte Elimination von Pharmaka durch Enzyminduktion in den Leberzellen nach höheren Dosen von Schlafmitteln

Verh. Dtsch. Ges. inn. Med. 69.Kongreß 1963 , 99

80 Remmer H. und H.-J. Merker

Enzyminduktion und Vermehrung von endoplasmatischem Retikulum in der Leberzelle während der Behandlung mit Phenobarbital (Luminal)

klin. Wschr. 1963 , 276, 41

81 Remmer H. und H.-J. Merker

Vermehrte Bildung von endoplasmatischem Retikulum in der Leberzelle unter Wirkung von Arzneimitteln

Arch. exp. Path. u. Pharmakol. 245, 76, 1963

82 Richter D. and R.M.C. Dawsen

The Ammonia and Glutamine Content of the Brain

J. biol. Chem. 176, 1199, 1948

83 Rothlin E. und W.R. Schalch

Zur Pharmakologie und Toxikologie des Scillirosids und des Scillirosidins

Helv. Physiol. Acta 1952, 427, 1o

84 Rümke Chr.L. und J. Bout

Beeinflussung der Hexobarbitalnarkose durch vorher verabfolgte Pharmaka

Arch. exp. Path. u. Pharmakol. 24o, 218, 196o

85 Stoll A. und J. Renz

Über Scillirosid, ein gegen Nager spezifisch wirksames Gift aus der roten Meerzwiebel

Helv. chim. Acta 1941, 43

86 Stoll A. und J. Renz

Spaltung von Herzglykosiden mit Enzympräparaten aus tierischen Organen

Helv. chim. Acta 1951, 782

87 Strecker H.J.

Glutamin Acid and Glutamin

in Richter: Metabolism of the Nervous System
Pergamon Press London/Oxford S. 459 1957

88 Stur O. und F. Zweimüller

Diagnose und Therapie der akuten gemma-Hexachlorcyclohexan-vergiftung bei Kleinkindern

Dtsch. med. Wschr. 1961, 1474

89 Tatum H.J. and F.L. Kozelka

Distribution, Excretion and Rate and Site of Detoxification of Metrazol

J. Pharmacol. exptl. Therap. 72, 284, 1941

90 Wilson J.B.

Reversibility of Tetraethyl-Pyrophosphate Inhibition

J. biol Chem. 190, 111, 1951

91 Wilson J.B.

Reactivation of Alkylphosphate Inhibited Enzyme

J. biol. Chem. 199 , 113 , 1952

92 Winton F.R.

The Rat-poisoning Substance in Red Squills

J. Pharmacol. exptl. Therap. 31, 123, 1927

93 Wirth W.

Zur Pharmakologie der Phosphorsäureester
Diäthyl-p-Nitrophenylphosphat ("Mintacol")

Arch. exp. Path. u. Pharmakol. 207,547, 1949

94 Wirth W.

Zur Pharmakologie der insektiziden Phosphorsäureester

Dtsch. med. Wschr. 1954, 1205

Herr Professor Dr. med. Herken gab mir in seinem Institut die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Arbeit. Ich erlaube mir, ihm an dieser Stelle dafür zu danken.

Ich danke auch Herrn Professor Dr. med. Koransky für das Interesse und die Unterstützung, die er meiner Arbeit zuteil werden ließ.

Lebenslauf

Am 3o. Mai 1938 wurde ich, Horst- Wilhelm Vohland, als Sohn des Diplomlandwirtes Dr. Walther Vohland und seiner Ehefrau Henriette, geb. Meyer, in Gruna in der Provinz Sachsen geboren.

Nach dem Besuch der Grundschulen in Gruna, Kaltenkirchen und Neumünster von 1944 bis 1951 wurde ich Schüler der Holstenschule Neumünster (Gymnasium mit neusprachlichem und mathematisch- naturwissenschaftlichem Zweig). Dort legte ich am 24. 2. 1958 die Reifeprüfung ab.

Anschließend studierte ich Medizin an der Georg- August- Universität Göttingen vom Sommersemester 1958 bis zum Wintersemester 1959/6o und bestand dort die naturwissenschaftliche Vorprüfung am 26. 2. 1959. Vom Sommersemester 196o bis zum Wintersemester 196o/61 setzte ich mein Studium an der Friedrich - Alexander- Universität Erlangen fort und legte dort am 1.3. 1961 die ärztliche Vorprüfung ab.

Seit dem Sommersemester 1961 studierte ich an der Freien Universität Berlin, an der ich am 2. 11. 1965 das medizinische Staatsexamen ablegte.

Im Sommersemester 1962 begann ich im Pharmakologischen Institut der Freien Universität unter der Leitung von Herrn Professor Dr. med. Koransky mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit.